

ZUR CHEMIE UND PHARMAKOLOGIE DER SAPONINE AUS
DODONAEA VISCOSA (L.) JACQ. UND SCHEFFLERA VENULOSA
(WIGHT ET ARN.) HARMS

CHRISTINE LUDWIG

Diss
München
1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554813_0032

Zur Chemie und Pharmakologie der Saponine aus
Dodonaea viscosa (L.) Jacq. und Schefflera venulosa
(Wight et Arn.) Harms

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Christine Ludwig
aus München

Juli 1985

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r
 2. Berichterstatter: Professor Dr. E. R e i m a n n
- Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juli 1985

GLIEDERUNG

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. ALLGEMEINER TEIL	2
Kennntnisstand über <i>Dodonaea viscosa</i>	
I. Systematik und Verbreitung	2
II. Botanische Beschreibung	3
III. Verwendung in der Volksmedizin und pharmakologische Untersuchungen	3
IV. Bisher bekannte Inhaltsstoffe	5
C. SPEZIELLER TEIL	8
I. Prüfung auf Saponine und Hämolytischer Index	8
II. Gewinnung eines Saponingemisches	9
1. Extraktion mit Methanol	9
2. Extraktion mit Wasser	12
III. Isolierung des Hauptsaponins	13
1. DCCC-Auftrennung	13
2. Präparative Dünnschichtchromatographie	16
IV. Strukturaufklärung des Hauptsaponins	18
1. Aglykon	18
1.1. Hydrolysemethoden zur Gewinnung des Aglykons	18
1.2. Reindarstellung des Aglykons	19
1.3. Strukturaufklärung des Aglykons	21
1.3.1. IR-Spektroskopie und Periodat-Oxidation	21
1.3.2. ¹³ C-NMR-Spektroskopie	22
1.3.3. Massenspektrometrische Untersuchung	24
2. Kohlenhydratteil	28
2.1. Qualitative Zuckeranalyse	28
2.2. FAB-MS Analyse	30

	Seite
2.3. Zuckerbestimmung über die Alditolacetate	32
2.4. Bestimmung der Zuckersequenz	34
2.5. Partialhydrolyse	40
2.6. Zuckerkonfiguration	42
2.7. Zuckerbindungsstelle am Aglykon	43
3. Säureteil	45
3.1. Identifizierung der Acylreste	45
3.1.1. Gaschromatographische Analyse	46
3.1.2. Dünnschichtchromatographische Untersuchung	50
3.1.3. FAB-MS des Dodonaea-Hauptsaponins	50
3.2. Gewinnung der Esteraglykone	53
3.2.1. Enzymatische Hydrolyse	53
3.2.2. Reindarstellung der Esteraglykone	55
3.2.3. GC-Untersuchung der Esteraglykone	56
3.3. Acetylierung	56
3.4. Darstellung und FAB-MS-Analyse der Acetonide	58
3.5. ¹ H-NMR-Untersuchung der Acetonide	60
3.5.1. Diacetonid des Dodonaea-Aglykons	60
3.5.2. Monoacetonid von Esteraglykon 1 (E1)	60
3.5.3. Monoacetonid von Esteraglykon 2 (E2)	66
V. Charakterisierung der Saponine aus <i>Schefflera venulosa</i>	74
1. Systematik und Herkunft der Droge	74
2. Isolierung eines Saponingemisches	74
3. Hydrolyse und Charakterisierung der Aglykone	77
4. Qualitative und quantitative Analyse der Zucker	81

	Seite
VI. Pharmakologische Untersuchungen	84
1. Viscarin-Carrageenin-Ödem-Test	84
2. Granulocyten-Test und Chemoluminiszenz-Test	87
3. Molluskizid-Test	91
D. ZUSAMMENFASSUNG	93
I. Strukturaufklärung des Hauptsaponins und pharmakologische Untersuchung des Saponin-gemisches aus <i>Dodonaea viscosa</i>	93
II. Charakterisierung der Saponine aus <i>Schefflera venulosa</i>	95
E. EXPERIMENTELLER TEIL	96
I. Herkunft der Drogen und Testsubstanzen	96
II. Chromatographische Arbeitsmethoden	97
1. Dünnschichtchromatographie	97
1.1. Adsorbentien	97
1.2. Fließmittelsysteme	97
1.3. Detektion	98
2. Präparative Schichtchromatographie	99
3. Säulenchromatographie	100
4. Droplet-Counter-Current-Chromatographie	101
5. Gaschromatographie	102
III. Isolierungen	103
1. Gewinnung des <i>Dodonaea</i> -Saponingemisches	103
1.1. Extraktion mit Methanol	103
1.2. Extraktion mit Wasser	104
2. Isolierung des <i>Dodonaea</i> -Hauptsaponins	105
3. Isolierung des <i>Dodonaea</i> -Aglykons	105
4. Isolierung der <i>Dodonaea</i> -Ester-aglykone	105
5. Isolierung des <i>Schefflera</i> -Saponingemisches	106
IV. Chemische und physikalische Arbeitsmethoden	106
1. Hydrolysen	106

	Seite
1.1. Alkalische Hydrolysen	106
1.2. Saure Hydrolysen	108
1.3. Partialhydrolyse	108
1.4. Mikrohydrolyse auf HPTLC-Platten	109
1.5. Enzymatische Hydrolysen	109
2. Derivate	110
2.1. Darstellung der Alditolacetate	110
2.2. Methylierung nach HAKOMORI	111
2.3. Darstellung der partiell methylierten Alditolacetate	111
2.4. Acetylierung	112
2.5. Darstellung der Acetonide	112
3. Physikalisch-chemische Untersuchungen	112
4. Hämolytischer Index	114
V. Meßdaten	115
1. ^{13}C -NMR-Daten des Dodonaea-Aglykons	115
2. ^1H -NMR-Daten der Acetonide	115
3. Massenspektren der partiell methylierten Alditolacetate	117
4. Optische Drehung, Schmelzpunkte und IR-Daten der Aglykone	118
VI. Pharmakologische Untersuchungen	119
1. Viscarin-Carrageenin-Ödemtest	119
2. Granulocyten-Test	120
3. Chemoluminiszenz-Test	121
4. Molluskizid-Test	123
F. LITERATURVERZEICHNIS	124

A. E I N L E I T U N G

Die in tropischen und subtropischen Gebieten beider Welt-hälften verbreitete, zur Sapindaceenfamilie gehörige Dodonaea viscosa (L.) Jacq. wird in der Volksmedizin hauptsächlich zur Behandlung von Rheuma, Gicht und Erkältungs-krankheiten verwendet.

Außerdem finden die Dodonaea-Samen in Indien als Fischgift Anwendung. Obwohl in der Literatur über das Vorkommen von Saponinen berichtet wird, fehlen genaue Kenntnisse über die Struktur dieser Verbindungen. Zudem ist unklar, auf wel-chen Wirkprinzipien die volksmedizinische Anwendung der Droge beruht.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Droge auf das Vorliegen von Saponinen zu prüfen, diese gegebenenfalls zu isolieren und deren Struktur zu klären.

Außerdem sollte versucht werden, mit Hilfe von pharmakolo-gischen Tests die volksmedizinische Verwendung der Pflanze wissenschaftlich zu belegen.

Bei der zweiten bearbeiteten Droge handelt es sich um Schefflera venulosa (Wight et Arn.) Harms, die zu der sapo-ninreichen Familie der Araliaceen gehört.

Auch hier sollten die in der Droge zu vermutenden Saponine isoliert und charakterisiert bzw. identifiziert werden.

B. A L L G E M E I N E R T E I L

Kenntnisstand über *Dodonaea viscosa*

I. Systematik und Verbreitung

Dodonaea viscosa (L.) Jacq., Enum. Syst. Pl. (1760) gehört innerhalb der Ordnung der Sapindales zur Familie der Sapindaceae.

Die Sapindaceenfamilie umfaßt etwa 140 Gattungen und 1500 Arten. ENGLER (1) teilt sie in die beiden Unterfamilien der Sapindoideae und der Dodonaeoideae ein. *Dodonaea viscosa* gehört zur zweiten Unterfamilie und wird weiter dem Tribus der Dodonaeae zugeordnet.

Als Basionym für die Pflanze gilt die Bezeichnung *Ptelea viscosa* L., Sp. Pl. (1753).

Außerdem sind folgende Synonyma in Gebrauch:

Dodonaea viscosa Mart., Flora (1839)

Dodonaea viscosa Royen ex Blume, Rumphia (1836)

Dodonaea viscosa Sieber ex Schlecht, Linnaea (1844)

Dodonaea kommt in tropischen und subtropischen Gebieten Saudi-Arabiens, Indiens, Südamerikas und Australiens vor.

Wildwachsend ist sie in den gebirgigen Teilen Saudi-Arabiens und Indiens bis zu einer Höhe von 2000 m anzutreffen, während sie in Nordindien als Heckenpflanze angebaut wird (2, 3, 4).

II. Botanische Beschreibung

Bei *Dodonaea viscosa* handelt es sich um einen immergrünen Strauch oder kleinen Baum, der eine Höhe von 4 - 6 m erreichen kann.

Die angulären Zweige tragen wechselständige, stiellose Blätter von lanzettlicher Form, die zum Blattgrund spitz zulaufen. Sie sind 6 - 10 cm lang, ganzrandig und von ledriger Beschaffenheit.

Die kleinen, gelbgrünen Blüten können eingeschlechtlich oder zwittrig sein. Sie sind in kurzen, endständigen Rispen angeordnet und durch 5 Kelchblätter, 8 Staubblätter und das Fehlen von Kronblättern charakterisiert.

Bei den *Dodonaea*-Früchten handelt es sich um 2-geteilte Flügelfrüchte, deren Flügel etwa 1,5 cm breit und 1 cm lang sind.

In jedem Fruchtknotenfach befinden sich 1 - 2 rundliche schwarze Samen (3,5-8).

III. Verwendung in der Volksmedizin und pharmakologische Untersuchungen

Laut CHOPRA (3) werden die Blätter von *Dodonaea viscosa* in Indien wegen ihrer fiebersenkenden und schweißtreibenden Wirkung bei Gicht und rheumatischen Beschwerden eingesetzt. Äußerlich dienen sie zur Behandlung von Wunden, Schwellungen und Verbrennungen.

MEKKAWI (2) erwähnt die Anwendung zur symptomatischen Behandlung von Erkältungskrankheiten.



Abb. 1

D O D O N A E A V I S C O S A

Nach Woody Flora of Taiwan (5)

Vermutlich aufgrund ihrer adstringierenden Wirkung wird die Rinde von *Dodonaea* zur Zubereitung von Bädern und warmen Umschlägen empfohlen (3).

Wie viele saponinhaltige Pflanzen wird *Dodonaea* in Indien auch als Fischgift verwendet (3).

In Peru werden die als "Janablätter" gehandelten *Dodonaea*-Blätter wie Cocablätter gekaut (4).

Über pharmakologische Wirkungen von *Dodonaea* berichten SUKKAWALA (9) und SACHDEV (10) mit folgenden Ergebnissen:

Wäßrige und alkoholische Extrakte von *Dodonaea*-Blättern zeigen "cardiodepressive" und koronargefäßkontrahierende Eigenschaften.

Dem ethanolischen Extrakt wird auch eine spasmolytische Wirkung auf glatte Muskulatur und Darmmuskulatur zugeschrieben.

Beide Extrakte besitzen schwache anthelmintische Wirkung. Zusätzlich wird über eine antibakterielle Aktivität des ethanolischen Extraktes berichtet.

SACHDEV (10) fand beim ethanolischen Extrakt auch eine hypoglykämische Wirkung.

IV. Bisher bekannte Inhaltsstoffe

Über die Inhaltsstoffe fast aller Pflanzenteile von *Dodonaea viscosa* liegen einige phytochemische Untersuchungen vor:

Aus den Blättern isolierten KOTAKE und KUWATA (11) 1936 erstmals die Hautriwainsäure, deren Struktur erst 1971 von HSÜ (12) vollständig aufgeklärt werden konnte. Es handelt sich um eine Hydroxyditerpensäure, die der ent-Clerodanreihe angehört (Abb. 2).

Zur selben Substanzklasse zählt auch die "Dodonaeasäure", die 1984 von SACHDEV und KULSHRESHTHA (13) aus dem Ethanol-extrakt der oberirdischen Pflanzenteile isoliert und strukturell aufgeklärt worden war (Abb. 2).

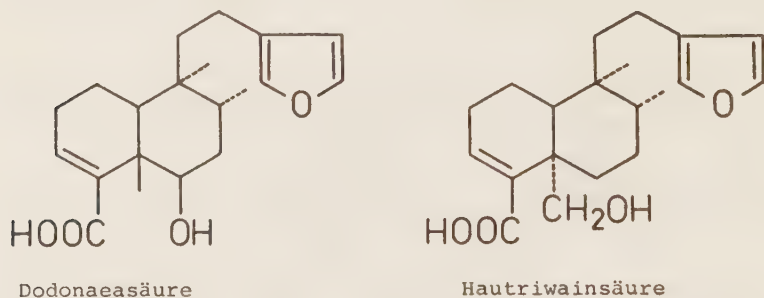


Abb. 2

Identifiziert wurden außerdem β -Sitosterin, Stigmasterin und β -Sitosterin- β -D-glucosid.

In einer ausführlichen Arbeit berichtete SACHDEV (14) über die Isolierung der Flavone Pinocembrin, Santin, Penduletin, Aliarin, 5-Hydroxy-3,6,7,4'-tetramethoxyflavon, 5,7,4'-Trihydroxy-3,6-dimethoxyflavon, Isorhamnetin-3-rhamnosylgalaktosid und eines neuen Flavonoids mit isoprenoider Seitenkette.

Früher wurden bereits Isorhamnetin-3-O-rutinosid, Hyperosid und Rutin in den Blättern (15) und zwei Kämpferolderivate in den Blüten (16) nachgewiesen.

Die frische Rinde der Pflanze enthält nach SASTRY (17) ein Leukocyanidin, Shikimisäure und Chlorogensäure.

Gerbstoffe wurden in einer Konzentration von 18,2 % in den Blättern gefunden (18).

MEKKAWI (2) fand in den Blättern ca. 0.3 % etherisches Öl und darin 4 Monoterpen-, 5 Sesquiterpenkohlenwasserstoffe, 2 Monoterpen- und 3 Sesquiterpenalkohole.

Die Samen von Dodonaea enthalten nach VICKERY (19) 14.3 % fettes Öl mit einem Gehalt von ca. 80 % ungesättigten Fettsäureestern.

Auch über das Vorkommen von Cyanolipiden (20) wurde berichtet.

1947 beschrieb PARIHAR (21) eine Substanz, die er in einer Ausbeute von 3.42 % aus den Samen erhalten hatte und als Dodonin bezeichnete.

Nach Hydrolyse erhielt er "Dodogenin" ($C_{23}H_{36}O_8$), das Saponineigenschaften besitzen sollte.

Auch in einer früheren Arbeit von GRESHOFF (22) wurde auf das Vorkommen von Saponinen hingewiesen.

Weitergehende Untersuchungen wurden nicht vorgenommen.

C. SPEZIELLER TEIL

I. Prüfung auf Saponine und Hämolytischer Index

Da nach HEGNAUER (23) Saponine in der Familie der Sapindaceae weit verbreitet sind, wurde die Dodonaea-Samendroge auf das Vorkommen dieser Substanzklasse geprüft.

Ein kräftiger und haltbarer Schüttelschaum des in Wasser aufgenommenen Methanolextraktes gab einen ersten Hinweis auf das Vorliegen von Saponinen.

Diese positive Reaktion wurde durch die dünnschichtchromatographische Untersuchung des Methanolextraktes im System Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10) bestätigt.

Im R_f -Bereich von 0.6-0.7 ließ sich mit Komarowskys Reagens eine breite, unscharf abgegrenzte Zone anfärben (Abb. 3).

Eine Bestätigung, daß es sich bei der "Komarowsky-positiven Zone" um Saponine handelt, lieferte das Besprühen mit Blutkörperchensuspension.

Es trat sofort eine starke Hämolyse auf. Dieses Verhalten ist charakteristisch für monodesmosidische Saponine.

Im Vergleich zum Standardsaponin, H.I.=30.000, wurde für den Extrakt aus der Samendroge nach der Methode von WAGNER und BLADT (26) ein Hämolytischer Index von 1000 ermittelt.

Das später isolierte, gereinigte Saponingemisch entsprach in seiner Hämolysekraft in etwa der des Standardsaponins.

II. Gewinnung eines Saponingemisches

1. Extraktion mit Methanol

Da die Samen von *Dodonaea viscosa* einen hohen Gehalt an fettem Öl aufweisen, wurde die grob gemahlene Droge zunächst mit Petrolether entfettet.

Bei der nachfolgenden Soxhletextraktion mit Methanol 90 % wurden außer Saponinen auch andere polare und lipophile Verbindungen erfaßt.

Die Abtrennung des lipophilen Anteils erfolgte durch Chloroformausschüttelung des zur Trockne eingedunsteten und in Wasser aufgenommenen Methanolextraktes.

Der Saponinanteil wurde dem Extrakt durch Ausschütteln mit wassergesättigtem Butanol entzogen.

Die vereinigten, zur Trockne eingedunsteten Butanolphasen wurden in wenig Methanol gelöst und zur Abtrennung noch vorhandener lipophiler Begleitstoffe durch Eintropfen in Ether gefällt. Nach wiederholter Fällung erhielt man einen gelblich-weißen, voluminösen Niederschlag.

Da dieser noch phenolische Verunreinigungen enthielt, wurde er nach Zugabe von wenig Methanol zweimal mit Aktivkohle behandelt und nochmals in Ether gefällt.

Das so erhaltene Saponingemisch war weiß und enthielt keine chromatographisch nachweisbaren, fremden Bestandteile mehr. Durch die Behandlung mit Aktivkohle waren ca. 25 % Saponingemisch durch Adsorption verlorengegangen.

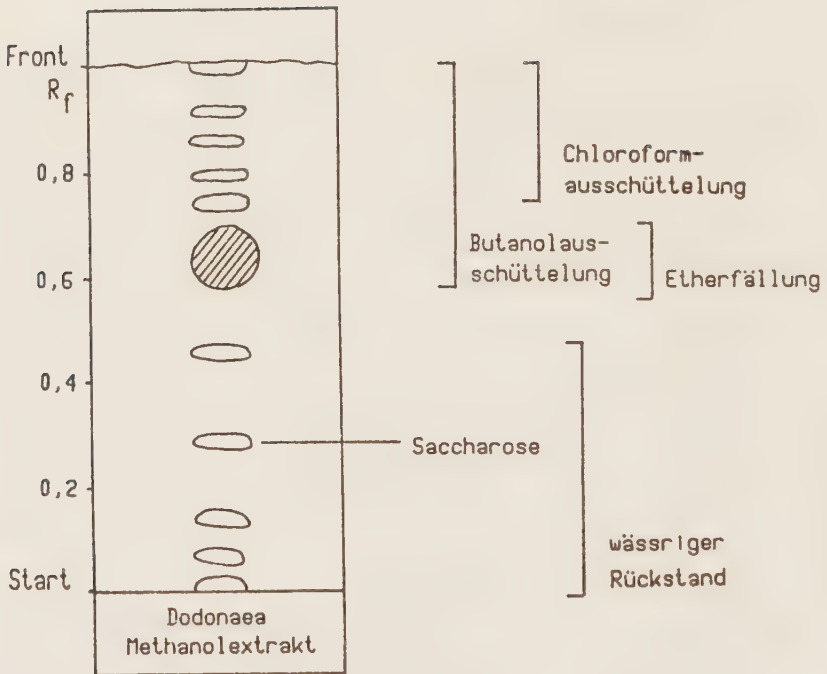


Abb. 3

DC-Schema des Isolierungsganges

Fließmittel: Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10)

Adsorbens: HPTLC-Fertigplatten Merck

Detektion: Komarowskys Reagens



Saponingemisch (hämolisierend)

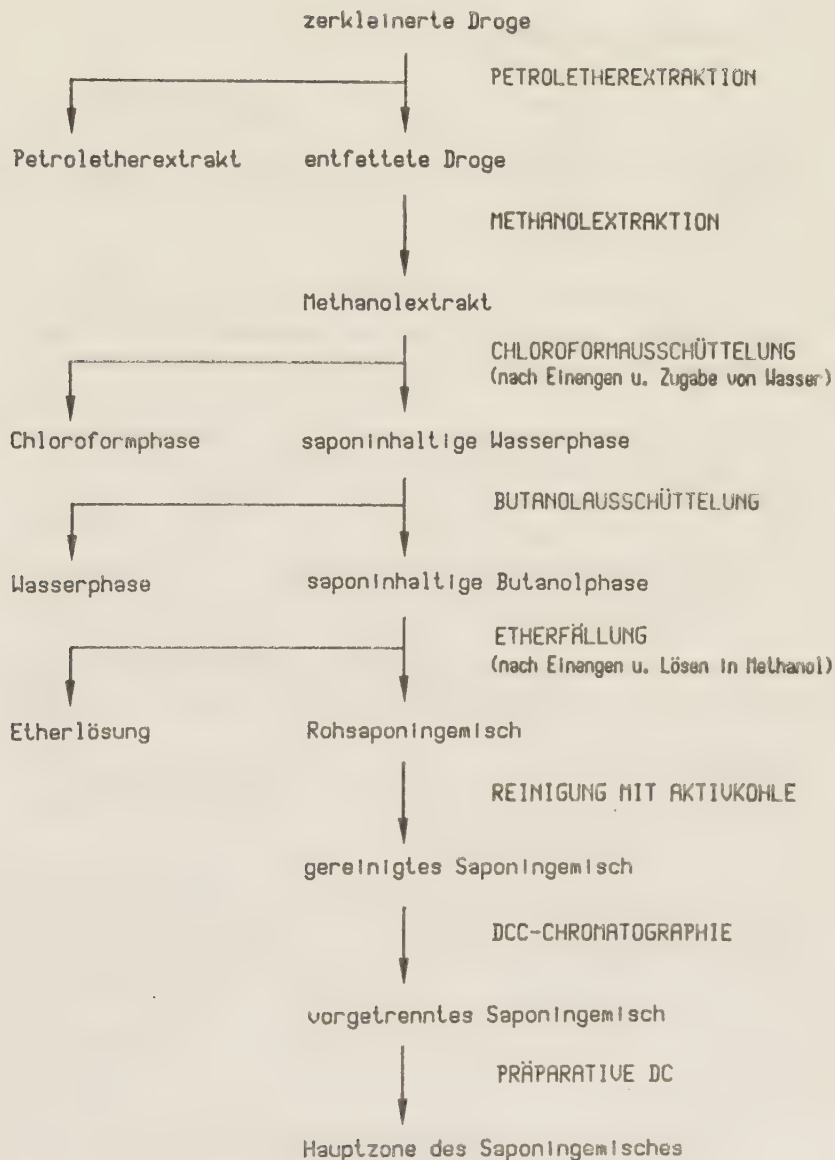


Abb. 4: Schema der methanolischen Extraktion

2. Extraktion mit Wasser

Da nach TSCHESCHE und WULFF (25) bei der Alkoholextraktion von Saponinen Artefaktbildungen wie Veresterungen, Verseifungen oder Acylwanderungen auftreten können (26-28), wurde die Droge nach Entfetten mit Petrolether einer Mazeration mit Wasser unterzogen.

Die Mazeration wurde nur eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt, um eine mögliche Hydrolyse der Saponine zu vermeiden.

Nach Filtrieren und Zentrifugieren des Mazerates erfolgte die Ausschüttelung der Saponine mit wassergesättigtem Butanol.

Zur weiteren Reinigung der Saponine wurde wie bei der Methanolextraktion verfahren.

Die Ausbeute an Saponingemisch bei wäßriger Mazeration erwies sich als geringer als bei erschöpfender methanolischer Soxhletextraktion.

Von Vorteil war jedoch, daß kaum lipophile Begleitstoffe mitisoliert wurden und somit deren Entfernung durch Ausschüttelung entfallen konnte.

Beide Arten der Isolierung führten zu einem chromatographisch identischen Saponingemisch.

Eine Artefaktbildung bei der Methanolextraktion kann somit ausgeschlossen werden.

III. Isolierung des Hauptsaponins

1. DCCC-Auftrennung

Die klassische Methode für die Auftrennung von Saponingemischen stellt die Säulenchromatographie dar, für die als Trennmaterialien meist Kieselgel, seltener Aluminiumoxid oder Ionenaustauscher verwendet werden.

Ein Versuch der Trennung des Dodonaea-Saponingemisches an einer Kieselgelsäule mit einem Chloroform-Methanol-Wasser-Gemisch brachte bei großem Substanzverlust nur unzureichende Trennergebnisse.

Als neuere Verfahren zur Saponintrennung werden die Säulenchromatographie an Umkehrphasen und die zentrifugalbeschleunigte präparative DC beschrieben (29).

Als Vortest auf die Trennung mittels Umkehrphase kann die DC-Untersuchung des Saponingemisches mit Reversed Phase HPTLC-Platten in Methanol-Wasser-Gemischen durchgeführt werden.

Auf diese Weise konnte das Dodonaea-Saponingemisch jedoch nicht in Einzelzonen aufgetrennt werden.

Als zur Zeit selektivste Methode zur Trennung polarer Naturstoffe gilt die Droplet-Counter-Current-Chromatographie.

Dieses flüssig/flüssig-chromatographische Verfahren ist von TANIMURA (30) entwickelt und 1980 von HOSTETTMANN (31) in seiner Technik und Anwendung auf verschiedene Substanzklassen beschrieben worden.

HOSTETTMANN und einige japanische Arbeitsgruppen hatten auf diese Weise schon erfolgreich Saponine getrennt (32-41).

Auch in unserem Arbeitskreis war hiermit die Trennung der Saponine aus *Gundelia tournefortii* (42) und *Colubrina asiatica* (43) gelungen.

Das geeignete Laufmittelsystem für die DCCC kann durch Testung verschiedener Systeme auf HPTLC-Platten entwickelt werden.

Für die Trennung des Dodonaea-Saponins wurden Gemische von Chloroform-Methanol-Wasser, Chloroform-n-Propanol-Methanol-Wasser und Chloroform-n-Butanol-Methanol-Wasser in verschiedener Zusammensetzung getestet.

Als Laufmittel für die chromatographische Untersuchung wurde jeweils die Unterphase verwendet.

Das Ziel war es, eine möglichst gute Auftrennung des Saponingemisches im R_f -Bereich zwischen 0.4 und 0.6 zu erreichen. Zu niedrige R_f -Werte bewirken eine Verschlechterung der Trennleistung, während höhere R_f -Werte bei besserer Trennleistung einen höheren Zeitaufwand bedeuten (bezüglich der Trennung mit den genannten Gemischen bei aufsteigendem Trennmodus).

Die beste Auftrennung konnte im System Chloroform-n-Propanol-Methanol-Wasser (9:2:12:8) erreicht werden. Die Saponinzone ließ sich im R_f -Bereich von 0.5 in mindestens 6 Einzelzonen auftrennen, wobei die mittlere Zone am stärksten ausgeprägt war (Abb. 5 u. 6).

Sie sollte als Hauptsaponin rein dargestellt werden.

Es erwies sich als günstig, die DCC-Chromatographie mit dem oben genannten System in aufsteigender Weise durchzuführen. Der Trennerfolg wurde durch HPTLC-Untersuchung in der Unterphase des DCCC-Systems überprüft.

In Abb. 5 sind die aus dem gereinigten Saponingemisch erhaltenen Hauptfraktionen in den jeweiligen Mengenverhältnissen dargestellt.

Ausgehend von 200 mg Probeneingabe konnten pro DCCC-Trennung 15 mg einer Fraktion D gewonnen werden, die neben dem Hauptsaponin nur noch eine weitere Zone enthielt.

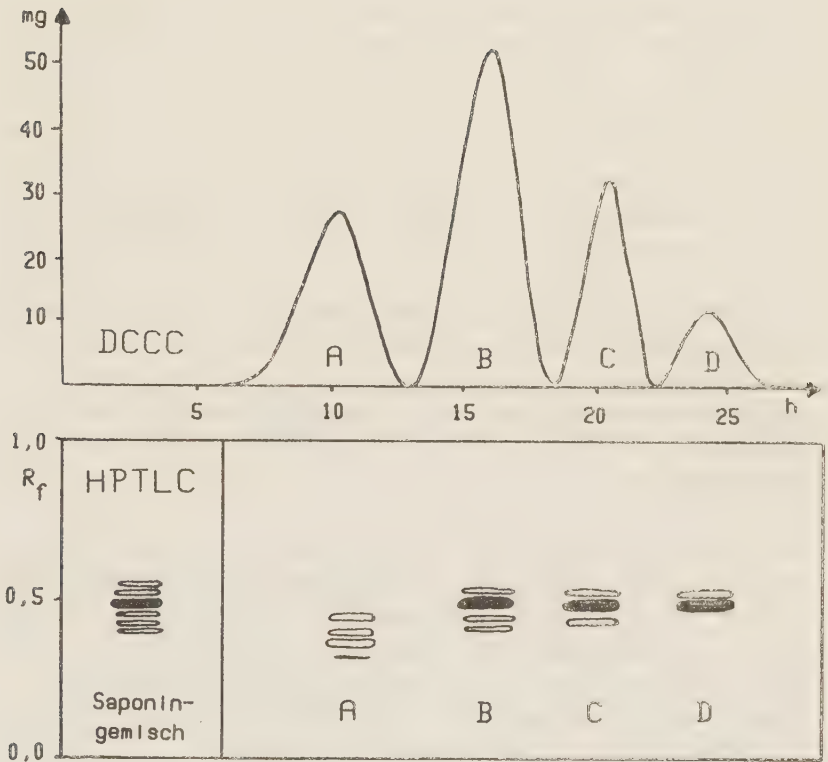


Abb. 5

Elutionsdiagramm der Hauptfraktionen einer DCCC-Trennung mit
HPTLC-Untersuchung

DCCC-Trennsystem: Chloroform-n-Propanol-Methanol-Wasser
(9:2:12:8)

Hauptfraktionen: A : 27 mg
B : 54 mg
C : 33 mg
D : 15 mg

HPTLC-Fließmittel: Untere Phase des DCCC-Trennsystems

Detektion: Komarowskys Reagens

Diese Begleitzone konnte auch durch eine DCCC-Feintrennung der Fraktion D nicht vom Hauptsaponin abgetrennt werden.

2. Präparative Dünnschichtchromatographie

Als Ausgangsprodukt für die präparative DC diente die durch DCCC-Trennung erhaltene Fraktion D des Saponingemisches.

Es erwies sich als günstig, den Kleberanteil der Kieselgelplatten durch Vorentwickeln mit Methanol-Wasser-Gemischen zu verringern.

Die aktivierten Platten wurden mit je 3-4 mg Saponingemisch beschickt und im System Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10) entwickelt.

Da die Saponine keine Fluoreszenzminderung zeigten, und das Besprühen mit Wasser eine zu ungenaue Auflösung ergab, mußte die Detektion durch Anfärben eines schmalen Randstreifens der Platte mit Komarowskys Reagens erfolgen.

Die Hauptzone wurde mit Methanol eluiert, die Suspension zentrifugiert und durch eine Glasfritte und ein Porenfilter filtriert.

Pro Platte konnte eine Ausbeute von etwa 1 mg chromatographisch reinem Hauptsaponin erhalten werden (Abb. 6), das heißt pro DCCC-Trennung und nachfolgender präparativer DC wurden etwa 4 mg des Hauptsaponins isoliert. Bei achtmaliger Durchführung des Trennungsganges konnten 30 mg des Dodonaea-Hauptsaponins gewonnen werden.

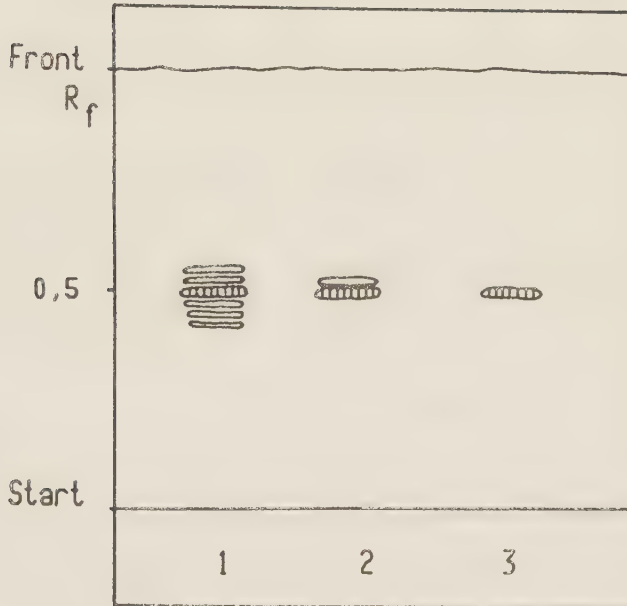


Abb. 6

DC-Trennung des gereinigten Saponingemisches

- 1 = gereinigtes Saponingemisch
- 2 = DCCC-vorgetrennte Fraktion D
- 3 = Hauptzone nach präparativer DC

Fließmittel: Chloroform-n-Propanol-Methanol-Wasser
(9:2:12:8) Unterphase
Adsorbens: HPTLC-Fertigplatten Merck
Detektion: Komarowskys Reagens

IV. Strukturaufklärung des Hauptsaponins

1. Aglykon

1.1. Hydrolysemethoden zur Gewinnung des Aglykons

Zur Darstellung der Aglykone aus Saponinen werden im allgemeinen Hydrolysen mit verdünnten Mineralsäuren wie HCl und H_2SO_4 durchgeführt.

Bei der Hydrolyse des Dodonaea-Saponingemisches mit Mineralsäuren unterschiedlicher Stärke - je 10 mg Saponingemisch wurden mit 5 ml verdünnter Säure 2-5 h hydrolysiert - entstand eine Vielzahl von Hydrolyseprodukten, ohne daß eine Hauptverbindung nachzuweisen war. Eine Verlängerung der Hydrolysezeit sowie die Verwendung von stärker konzentrierten Säuren brachte keine Verbesserung, sondern führte zur Zersetzung des Geningemisches.

Alkalische Hydrolyse

Da das Hydrolyseverhalten des Dodonaea-Saponingemisches charakteristisch für Estersaponine ist, versuchten wir eine alkalische Hydrolyse mit 0,5N NaOH. Beim Vorliegen von Estersaponinen werden hierdurch die organischen Säuren abgespalten und es entstehen die esterfreien, jetzt hydrophileren Saponine.

Die DC-Untersuchung des Hydrolysates zeigte anstelle der Saponinzone bei R_f 0.6-0.7 (vgl. Abb. 3 S. 10) ein polareres Reaktionsprodukt im R_f -Bereich von 0.5 (Fließmittel: Chloroform-Methanol-Wasser 64:50:10).

Beim Ansäuern des alkalischen Hydrolysates war zudem ein auf freigesetzte organische Säuren hindeutender fruchtiger Geruch wahrnehmbar.

Saure Hydrolyse

Dieses bei der alkalischen Hydrolyse entstandene entacylierte Produkt wurde zur Abspaltung des Kohlenhydrateiles mit verdünnter Mineralsäure weiterhydrolysiert.

Durch 2-stündiges Kochen mit 10 %iger methanolischer Salzsäure konnte eine quantitative Hydrolyse zum Aglykon erreicht werden.

Dieses wurde nach Zugabe von Wasser und Abrotieren des Methanols mit Dichlormethan ausgeschüttelt.

Das Sapogenin hatte im System Dichlormethan-Ethylacetat-Methanol (10:3:4) einen R_f -Wert von 0.63 (Abb. 7). Beim Besprühen mit Komarowskys Reagens gab es eine blau-violette Färbung.

Die Abbildung zeigt, daß von den mitchromatographierten Triterpensapogeninen das Protoäscigenin des Aesculus-Saponins fast gleiche Laufhöhe wie das Dodonaea-Aglykon hatte. Alle anderen Testverbindungen (Abb. 7 Testsubstanzen 4,5,6) wiesen höhere R_f -Werte auf. Beim Dodonaea-Aglykon sollte es sich demnach um ein relativ polares Sapogenin handeln.

1.2. Reindarstellung des Aglykons

Wir chromatographierten das nach alkalischer und saurer Hydrolyse entstandene Produkt an einer Kieselgelsäule mit dem zur Dünnschichtchromatographie verwendeten Laufmittel.

Ausgehend von einer Auftragemenge von 250 mg konnten ca. 50 mg Aglykon in reiner Form und ca. 100 mg Aglykon mit geringen Verunreinigungen erhalten werden.

Aus Chloroform-Methanol-Gemischen kristallisierte die Substanz in feinen weißen Nadeln, die bei 300 - 305 °C unter

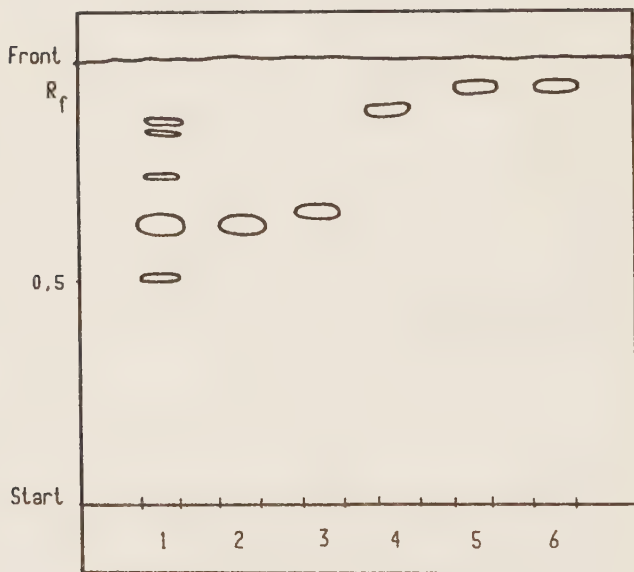


Abb. 7

DC-Trennung des Aglykongemisches

1 = Hydrolysat des gereinigten Saponingemisches nach alkalischer und saurer Hydrolyse

2 = reines Aglykon

3 = Protoäscigenin

4 = Hederagenin

5 = Oleanolsäure

6 = Ursolsäure

Fließmittel: Dichlormethan-Ethylacetat-Methanol (10:3:4)

Detektion: Komarowskys Reagens

Zersetzung schmolzen.

Durch zweimalige Umkristallisation des noch verunreinigten Aglykons konnte auch dieses in reiner Form erhalten werden.

1.3. Strukturaufklärung des Aglykons

Nach den Ergebnissen der alkalischen Hydrolyse und aufgrund des DC-Vergleichs war das Vorliegen der in Sapindaceen üblicherweise vorkommenden Triterpensäuren wie Oleanolsäure, Ursolsäure und Hederagenin (23, 44-47) auszuschließen.

Ähnlich dem Protoäscigenin sollte es sich um ein mindestens hexahydroxyliertes Triterpen handeln.

1.3.1. IR-Spektroskopie und Periodat-Oxidation

Im IR-Spektrum (Abb. 8) des Aglykons wies eine sehr stark ausgeprägte Hydroxyl-Bande bei 3350 cm^{-1} auf das Vorliegen mehrerer OH-Gruppen hin.

Das Fehlen einer C=O-Valenzschwingung bei 1700 cm^{-1} schloß eine Säuregruppe im Aglykon aus.

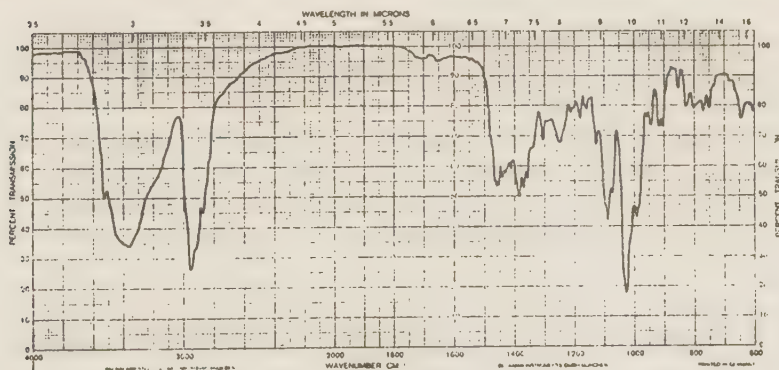


Abb. 8: IR-Spektrum des Dodonaea-Aglykons

Die in vielen Triterpenen vorhandene C-12/C-13 isolierte Doppelbindung liefert eine Bande bei 1650 cm^{-1} . Diese ist jedoch so schwach ausgeprägt, daß sie nicht zur Beweisführung herangezogen werden kann.

Periodat-Oxidation

Um nachzuprüfen, ob eine vicinale Diolgruppierung wie beim Protoäscigenin vorliegt, versuchten wir eine Periodat-Oxidation im Mikromaßstab auf der DC-Platte.

Das Dodonaea-Aglykon und Protoäscigenin wurden im System Dichlormethan-Ethylacetat-Methanol (10:3:4) entwickelt (vgl. Abb. 7), die Platte mit Natriummetaperiodatlösung besprüht und nach kurzer Zeit mit Benzidinlösung nachbesprüht.

Beide Substanzen erschienen als weiße Zonen auf blauem Untergrund.

Für das Dodonaea-Aglykon war somit ebenfalls eine Diolgruppierung sehr wahrscheinlich.

1.3.2. ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Das ^{13}C -NMR-Spektrum des Dodonaea-Aglykons wies Signale für 30 C-Atome auf (Abb. 9).

Bei den zwischen 60 und 80 ppm liegenden sechs Signalen könnte es sich um hydroxylierte C-Atome handeln, während die beiden Signale bei 124.6 und 144.8 ppm von sp_2 -hybridisierten Kohlenstoffatomen an einer Doppelbindung stammen müßten.

Somit war das Vorliegen eines einfach ungesättigten, sechsfach hydroxylierten Triterpenalkohols wahrscheinlich.

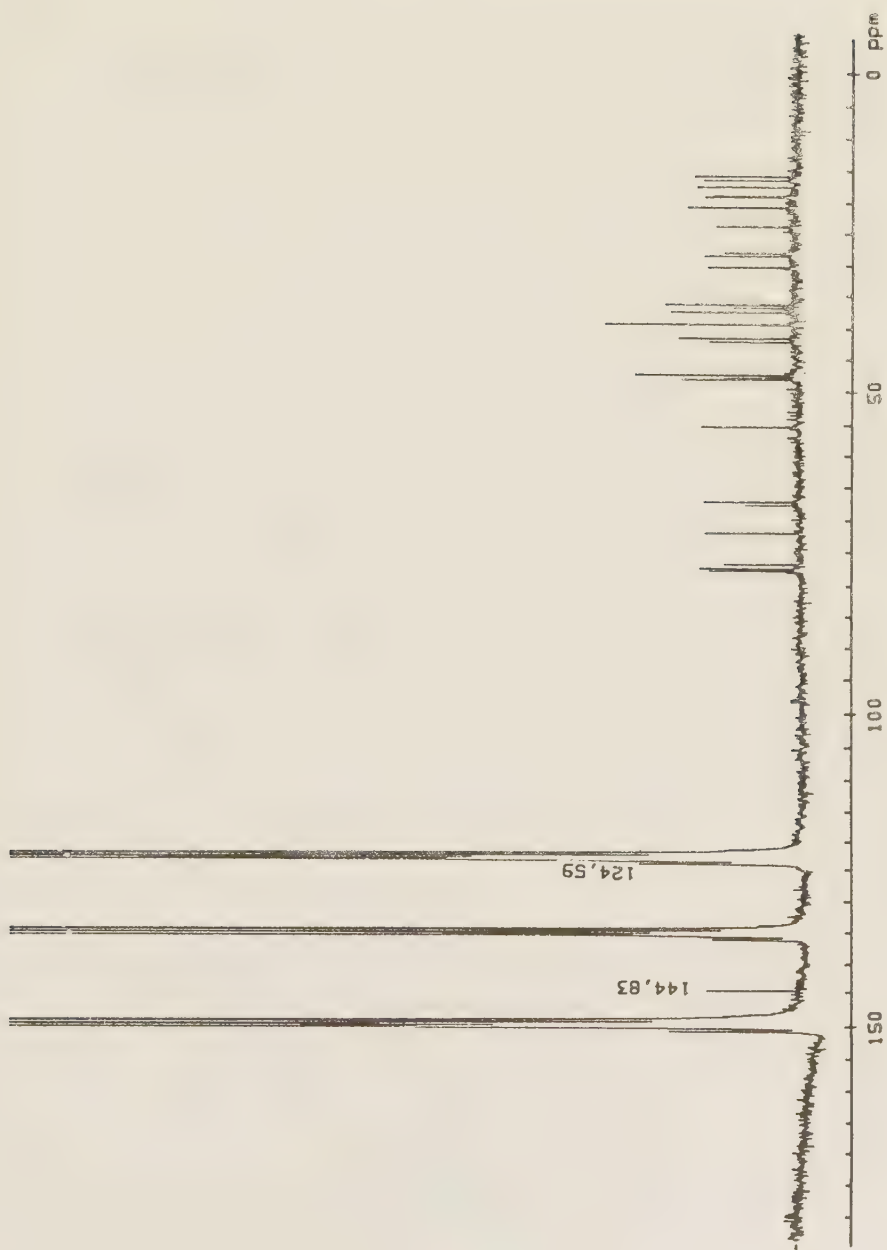


Abb. 9: ^{13}C -NMR-Spektrum des Dodonaea-Aglykons (Deuteropyridin)

Carbonyl- und Säuregruppen konnten in Übereinstimmung mit dem IR-Spektrum ausgeschlossen werden, da keine chemischen Verschiebungswerte über 150 ppm auftraten.

1.3.3. Massenspektrometrische Untersuchung

Das Aglykon zeigte den Molekülpeak bei m/z 506 (Tabelle 1).

Die Retro-Diels-Alder Fragmentierung lieferte ein Hauptfragment der Masse 207 und ein zweites bei m/z 298.

Als typische Abspaltungen wurden Massendifferenzen von 18 (bzw. 2×18 und 3×18) und 31 registriert.

Der Verlust von 18 Masseneinheiten dürfte auf Wasserabspaltungen aus den Hydroxylgruppen des Aglykons zurückzuführen sein, während die Differenz von 31 Masseneinheiten auf die Abspaltung einer CH_2OH -Gruppe schließen ließ.

Bei einem Vergleich des Molekulargewichtes und der MS-Fragmentierung des Dodonaea-Aglykons mit Literaturwerten hochhydroxylierter Triterpenalkohole ergab sich volle Übereinstimmung mit dem von HILLER (48) aus *Sanicula europaea* isolierten R_1 -Barrigenol.

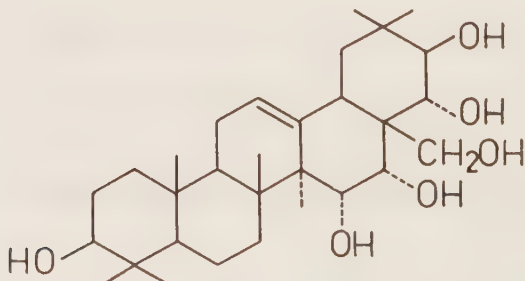


Abb. 10: R_1 -Barrigenol

Tab. 1: Ionen des Massenspektrums und ihre Zuordnung

m/z	Zuordnung
506	M (Molekülpeak)
488	M- 18 (H ₂ O)
470	M- 36 (2 H ₂ O)
457	M- 31 (CH ₂ OH) - 18 (H ₂ O)
439	M- 31 (CH ₂ OH) - 36 (2 H ₂ O)
421	M- 31 (CH ₂ OH) - 54 (3 H ₂ O)
298	A (Retro-Diels-Alder-Fragment)
280	A- 18 (H ₂ O)
267	A- 31 (CH ₂ OH)
262	A- 36 (2 H ₂ O)
249	A- 31 (CH ₂ OH) - 18 (H ₂ O)
231	A- 31 (CH ₂ OH) - 36 (2 H ₂ O)
207	B (Retro-Diels-Alder-Fragment)
189	B- 18 (H ₂ O)

A: m/z = 298

B: m/z = 207

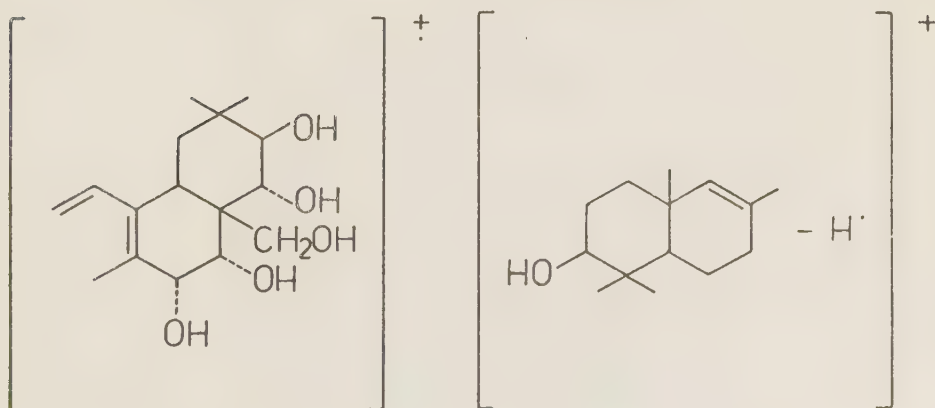


Abb. 11: Retro-Diels-Alder-Fragmente des Dodonaea-Aglykons

Bei einem DC-Vergleich des Dodonaea-Aglykons mit dem von Prof. Hiller zur Verfügung gestellten R₁-Barrigenol zeigten beide Verbindungen gleiche R_F-Werte.

(Fließmittel und Detektion wie bei Abb. 7)

Da auch die Schmelzpunkte und die IR-Spektren (Abb. 12) übereinstimmten, kann die Identität des Dodonaea-Aglykons mit R₁-Barrigenol (3 β , 15 α , 16 α , 21 β , 22 α , 28-Hexahydroxy-12-oleanen) als gesichert gelten.

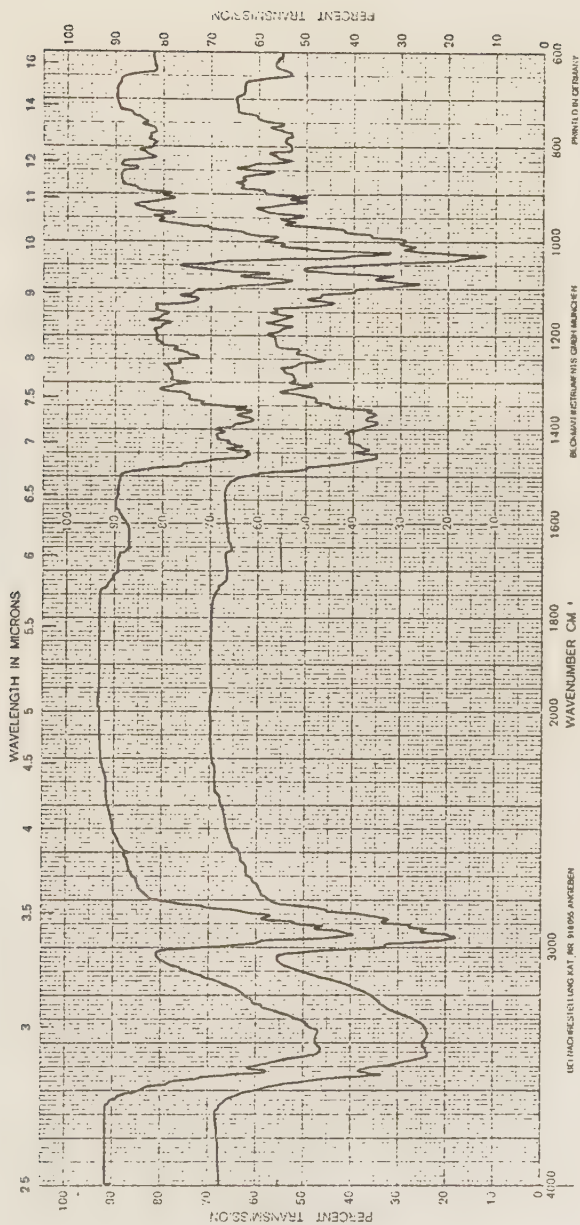


Abb. 12: IR-Überlagerungsspektrum des Dodonaea-Aglykons (unten) mit R₁-Barrigenol (oben)

2. Kohlenhydratteil

2.1. Qualitative Zuckeranalyse

Für den qualitativen Nachweis der Monosaccharidkomponenten wurde das Dodonaea-Hauptsaponin drei Stunden mit 2N Tri-fluoressigsäure hydrolysiert (49). Dünnschichtchromatographisch konnten Arabinose und Galaktose identifiziert werden. Daneben waren Spuren von Glucuronsäurelacton nachzuweisen, das sich unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse aus Glucuronsäure bildet (50).

Zur Sicherung dieses Ergebnisses führten wir eine Hydrolyse im Mikromaßstab nach KARTNIG (51) durch. Eine HPTLC-Platte, auf die das Dodonaea-Hauptsaponin und als Vergleichssubstanzen Arabinose, Galaktose und Glucuronsäure aufgetragen worden waren, wurde 30 min mit rauchender HCl bedampft, im System Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10) entwickelt und die Zucker mit Diphenylaminophosphorsäure detektiert.

Sowohl aus der Glucuronsäurevergleichssubstanz als auch aus dem Glucuronsäureanteil des Saponins hatte sich das Lacton gebildet (Abb. 13).

Dieses liegt, wie die Abbildung weiter zeigt, im Gleichgewicht mit der freien Säure vor.

Nach den dünnschichtchromatographischen Analysen enthielt der Kohlenhydratteil des Dodonaea-Saponins somit Arabinose, Galaktose und Glucuronsäure.

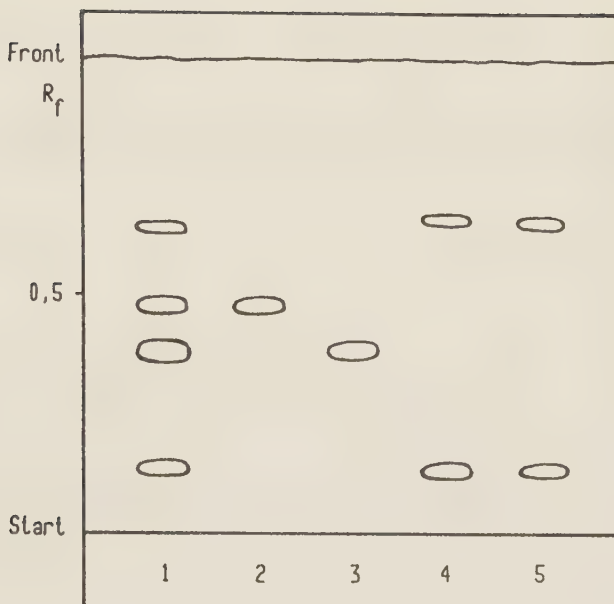


Abb. 13

Zuckerchromatogramm des Dodonaea-Saponins nach
Mikrohydrolyse

- | | |
|---------------------------|---------------------|
| 1 = Dodonaea-Hauptsaponin | aufgetragen: |
| 2 = Arabinose | vor Mikrohydrolyse |
| 3 = Galaktose | |
| 4 = Glucuronsäure | |
| 5 = Glucuronsäurelacton | nach Mikrohydrolyse |

Vorbehandlung: 30 min Bedampfen mit rauchender HCl
 Fließmittel: Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10)
 Adsorbens: HPTLC-Fertigplatten Merck
 Detektion: Diphenylaminophosphorsäure-Reagens

2.2. FAB-MS Analyse

In letzter Zeit sind zur Analyse von Glykosiden vor allem die Desorptions Chemische Ionisation (DCI) (52-54), die Felddesorption (FD) (55-57), sowie die Sekundärionen- (SIMS) (58) und die Fast-Atom-Bombardment-Massenspektrometrie (FAB-MS) (59) eingesetzt worden.

Für unsere Untersuchungen wurde die Fast-Atom-Bombardment-Massenspektrometrie gewählt.

Das Prinzip dieser Ionisierungsmethode besteht darin, daß durch Ladungstrennung erzeugte $\text{Ar}^{+/-}$ -Ionen in einer Stoßkammer auf neutrale Ar -Atome treffen. Ein durch Ladungsaustausch resultierender Ar^0 -Strahl trifft auf die in einer Matrix (meist Glycerin) eingebettete Probe und erzeugt dort Ionen. Diese können als positive $(\text{M}+\text{H})^+$ oder als negative $(\text{M}-\text{H})^-$ Ionen registriert werden.

Das FAB-MS wurde von dem durch alkalische Hydrolyse erhaltenen Desacyl-Saponin aufgenommen. Es zeigte das $(\text{M}-\text{H})^-$ Molekülion bei m/z 975.

Daraus resultiert, daß das Glykosid ein Aglykon vom Molekulargewicht 506 mit $(\text{M}-\text{H})^- = 505$ besitzt und je 1 Mol Pentose, Hexose und Uronsäure enthalten muß (Abb. 14).

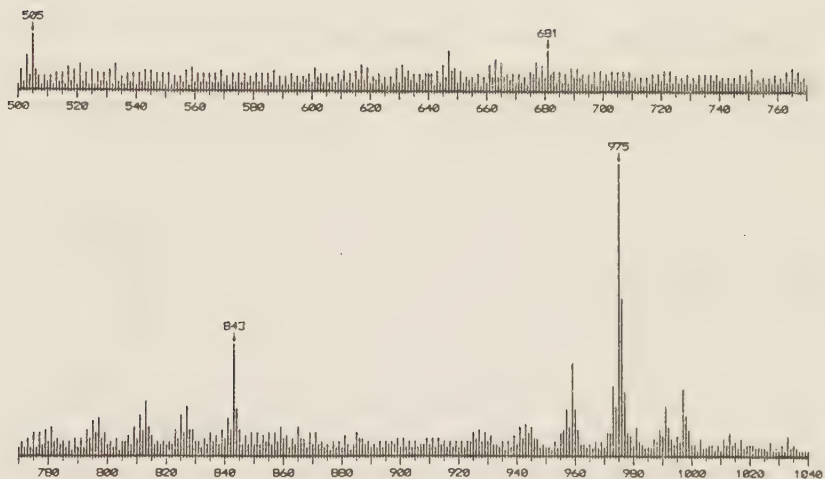
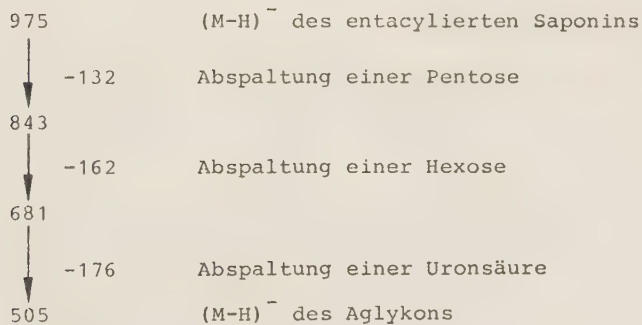


Abb. 14

Negatives FAB-MS des entacylierten Dodonaea-Saponins



2.3. Zuckerbestimmung über die Alditolacetate

Zur Bestätigung der DC- und MS-Untersuchungen führten wir die Zucker nach Hydrolyse des Hauptsaponins in ihre Alditolacetate über und bestimmten diese gaschromatographisch (60, 61).

Parallel wurden die Alditolacetate von einem Testgemisch aus Arabinose, Galaktose und Glucuronsäure im Verhältnis 1:1:1 hergestellt.

Die Proben wurden nach trifluoressigsaurer Hydrolyse mit NaBH_4 zu den Alditolen reduziert und nach Acetylierung gaschromatographisch analysiert.

Wie Abb. 15 zeigt, waren im Vergleichsgemisch die Alditolacetate von Arabinose, Galaktose und Glucose im Verhältnis von etwa 1:1:0.4 nachzuweisen. Demnach waren etwa 40 % des Glucuronsäureanteils zu Glucose reduziert und zum Glucitolacetat derivatisiert worden.

Im Alditolacetatgemisch des Dodonaea-Saponins konnten ebenfalls Arabinose, Galaktose und Glucose identifiziert werden. Aufgrund von drei durchgeführten Einzelbestimmungen wurde ein Molverhältnis von 1:1:0.4-0.7 ermittelt. Es waren demnach zwischen 40 und 70 % der Glucuronsäure als Glucitolacetat erfaßt worden.

Die wechselnden und im Vergleich zu Arabinose und Galaktose geringeren Glucosewerte lassen sich durch folgende Mechanismen erklären:

Bei der sauren Hydrolyse des Saponins sowie des in gleicher Weise behandelten Testgemisches bildet sich aus einem Teil der Glucuronsäure das Lacton. Unter den Bedingungen der nachfolgenden Reduktion mit NaBH_4 wird nur das Glucuronsäurelacton zum Glucitol reduziert. Die freie Hexuronsäure reagiert nur bis zur Stufe der Aldonsäure, da die Reduktion der

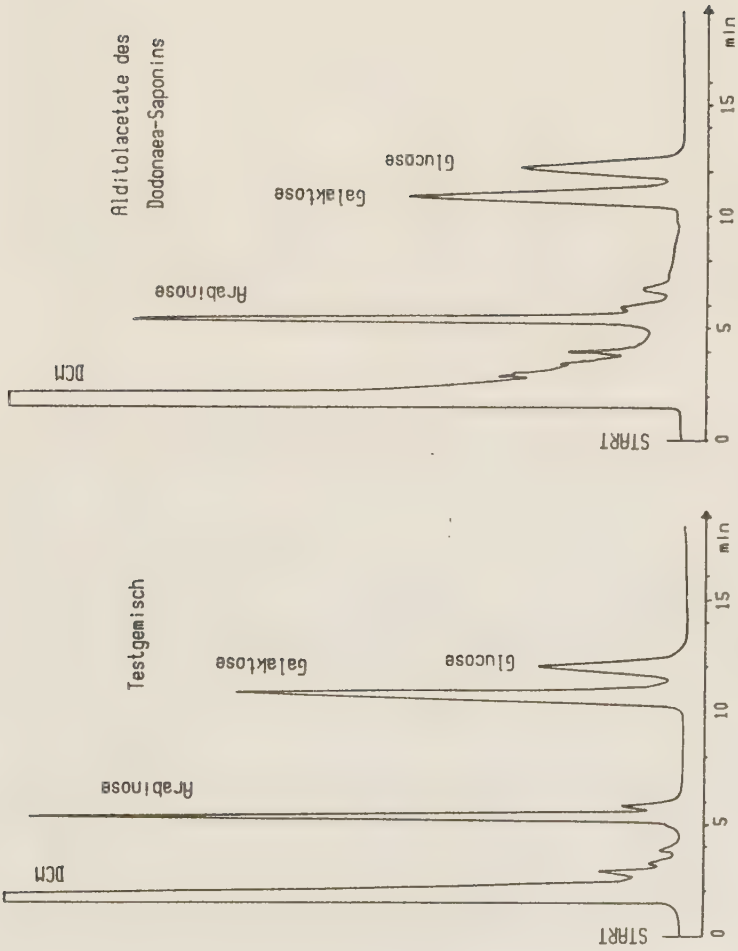


Abb. 15: Gaschromatogramm der Alditolacetate

Carboxylgruppe mit NaBH_4 nicht möglich ist. Schon aus diesem Grund kann nicht mit einer quantitativen Umsetzung des Glucuronsäureanteiles zum Glucitol gerechnet werden. Hinzu kommt, daß das Glucuronsäurelacton gegenüber Alkalien sehr unbeständig ist und demzufolge bei der Reduktion mit NaBH_4 Abbaureaktionen unterliegt (50). Sowohl das Ausmaß der Lactonisierung bei saurer Hydrolyse als auch der Reduktion des Lactons durch NaBH_4 sind kaum reproduzierbar (50, 62).

2.4. Bestimmung der Zuckersequenz

Eine genaue und bewährte Methode zur Ermittlung der Sequenz von Monosacchariden stellt die von BJÖRNDAL (63) vorgeschlagene GC-MS-Analyse der partiell methylierten Alditolacetate dar.

Wie bei der FAB-Massenspektrometrie gingen wir auch hierfür vom entacylierten Saponin aus.

Unter den in der Literatur angegebenen Methylierungsverfahren (64-67) wählten wir die Methode nach HAKOMORI (68), da sie nach unseren Erfahrungen die vollständigste Methylierung in einem Schritt gewährleistet.

Die Probe wurde hierzu unter Stickstoffbegasung in Dimethylsulfoxid gelöst und nach Behandeln mit Natrium-methyl-sulfinylmethanid mit Methyljodid umgesetzt.

Das methylierte Saponin wurde zur Abspaltung der Zucker mit Trifluoressigsäure hydrolysiert. Im nächsten Schritt wurden die partiell methylierten Zucker zu ihren Alditolen reduziert. Als Reduktionsmittel diente NaBD_4 anstelle von NaBH_4 , da es die Markierung von C-1 (bzw. C-1 und C-6 der Glucuronsäure) und damit eine eindeutige Festlegung der Substitution ermöglicht.

Das reduzierte Gemisch wurde acetyliert und durch GC-MS-Analyse identifiziert (69).

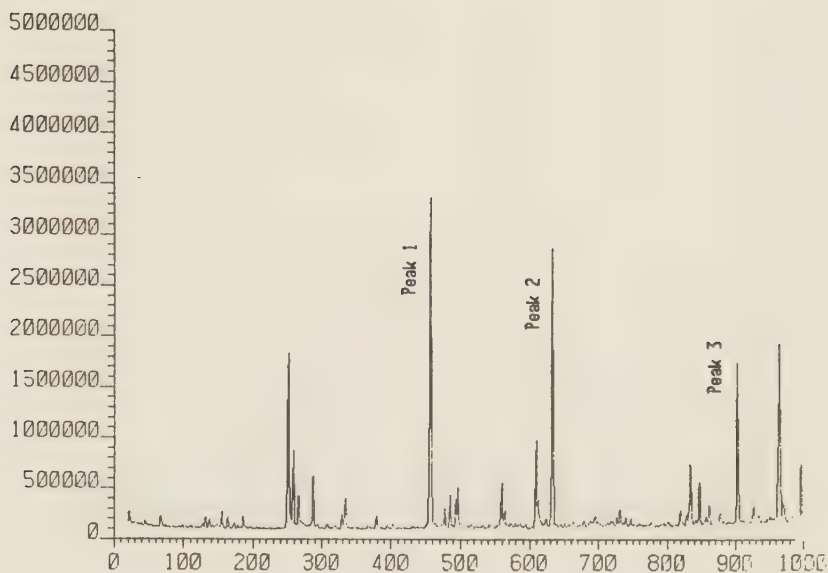


Abb. 16

Gaschromatogramm der partiell methylierten Alditolacetate
(Säule: OV 1701, 100 °C, 3 °/min)

Tab. 2: Zuordnung der GC-Peaks zu den entsprechenden
Alditolacetaten

Peak	Retentions- zeit (min)	Alditolacetate (deuteriert)	Charakteristische Bruchstücke (m/z)
1	26,8	1,4-Di-O-acetyl- 2,3,5-tri-O- methyl-pentitol	87,101,102,118, 129,161,162
2	35,7	1,5-Di-O-acetyl- 2,3,4,6-tetra- O-methyl-hexitol	102,118,129,145, 161,162,205
3	49,0	1,2,3,5,6-Penta- O-acetyl-4-O- methyl-hexitol	89,131,191,262

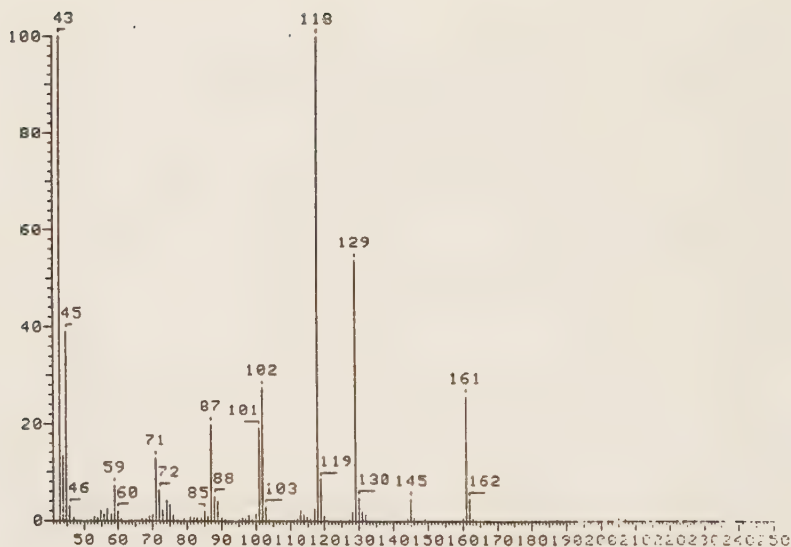
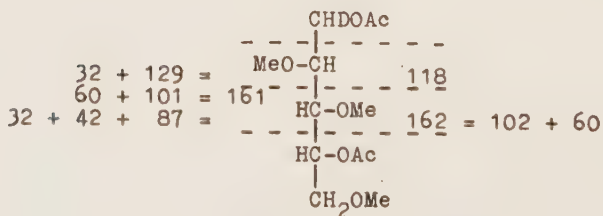
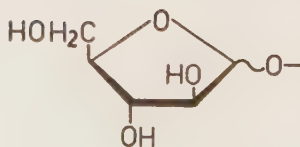


Abb. 17

1,4 -Di-O-acetyl-2,3,5-tri-O-methyl-pentitol (Peak 1)



Arabinofuranose
endständig



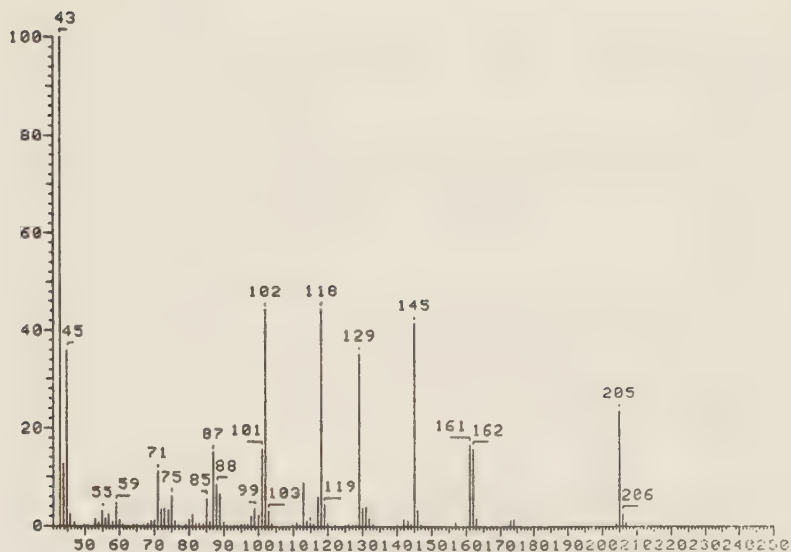
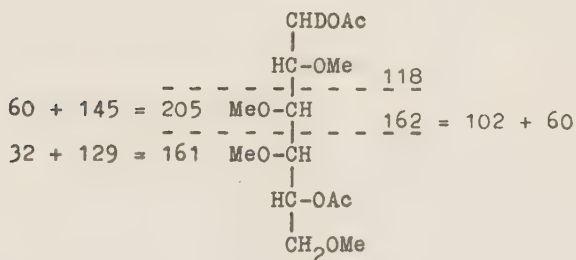
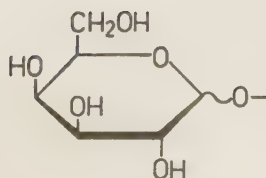


Abb. 18

1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-hexitol (Peak 2)



Galaktopyranose
endständig



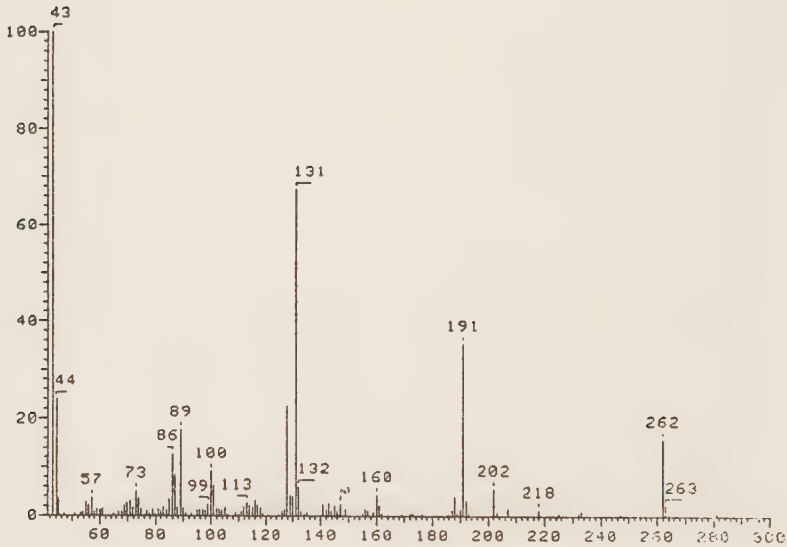
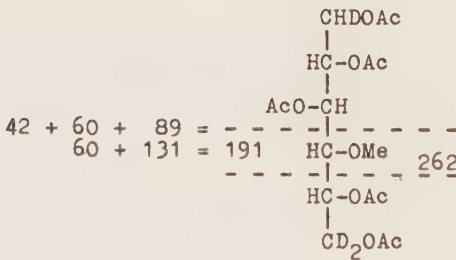
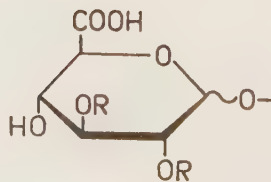


Abb. 19

1,2,3,5,6-Penta-O-acetyl-4-O-methyl-hexitol (Peak 3)



Glucuronopyranose
2,3-verknüpft



In Abb. 16 sind die im GC erhaltenen partiell methylierten Alditolacetate dargestellt.

Mit Hilfe von Fragmentierungsregeln und Literatur-Vergleichsdaten (69) konnten die Peaks den entsprechenden Alditolacetaten bzw. Monosacchariden des Dodonaea-Saponins zugeordnet werden (siehe Tabelle 2 und Abb. 17-19).

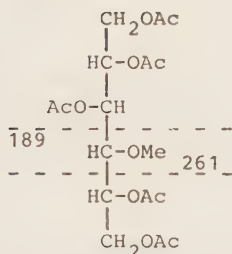
Wie aus dem Methylierungs- bzw. Acetylierungsmuster der beiden identifizierten Alditolderivate 1,4-Di-O-acetyl-2,3,5-tri-O-methyl-pentitol und 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-hexitol zu entnehmen ist, muß es sich sowohl bei der furanoiden Arabinose als auch bei der pyranoiden Galaktose um endständige Zucker handeln.

Die Glucuronsäure muß somit an das Aglykon gebunden und durch die beiden endständigen Zucker substituiert sein.

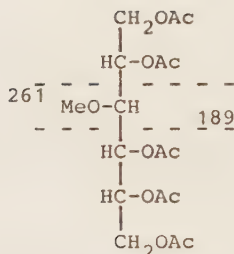
Eine Unterscheidung zwischen 2,3- und 2,4-substituierter Glucuronsäure konnte durch Deuterierung von C-1 und C-6 getroffen werden.

Abb. 20 zeigt, daß bei 2,3- und 2,4-Substitution die partiell methylierten Alditolacetate von nicht deuterierter Glucuronsäure die gleiche Massenfragmentierung aufweisen.

Durch Deuterierung ist es jedoch möglich, zwischen C-1 (1D) und C-6 (2D) zu unterscheiden und somit die Substitution eindeutig festzulegen. Wir erhielten, wie aus Abb. 19 hervorgeht, im MS des "Peak3" Fragmente bei m/z 262 (mit C-1, 1D) und m/z 191 (mit C-6, 2D) und leiteten daraus die 2,3-Substitution der Glucuronsäure ab. Bei 2,4-Substitution hätten dagegen Fragmente bei m/z 263 (mit C-6, 2D) und 190 (mit C-1, 1D) auftreten müssen.



2,3-Substitution



2,4-Substitution

Abb. 20: Partiell methylierte Alditolacetate von 2,3- und 2,4-substituierter Glucuronsäure

2.5. Partialhydrolyse

Die Analyse der partiell methylierten Alditolacetate konnte keinen Aufschluß darüber geben, welcher der beiden endständigen Zucker jeweils an das C-2 bzw. C-3 der geninständigen Glucuronsäure gebunden ist. Die genaue Zuckersequenz kann nur ermittelt werden, wenn es gelingt, einen der beiden endständigen Zucker selektiv abzuspalten.

Zu diesem Zweck versuchten wir Partialhydrolysen mit verdünnter Salzsäure (0.1N), Ameisensäure (50-70 %) und Trifluoressigsäure (0.1N-1N).

Bei Hydrolyse des entacyclierten Saponins mit den genannten Säuren bei verschiedenen Temperaturen war dünnschichtchromatographisch die Entstehung eines Zwischenproduktes zu verfolgen (Zone X in Abb. 21).

Aus diesem konnten jedoch nach Bedampfen der Platte mit HCl und Entwicklung quer zur ersten Laufrichtung Arabinose, Galaktose sowie Glucuronsäurelacton nachgewiesen werden (Abb. 21). Zudem waren im Partialhydrolysat kein Disaccharid, sondern nur Arabinose und Galaktose zu identifizieren.

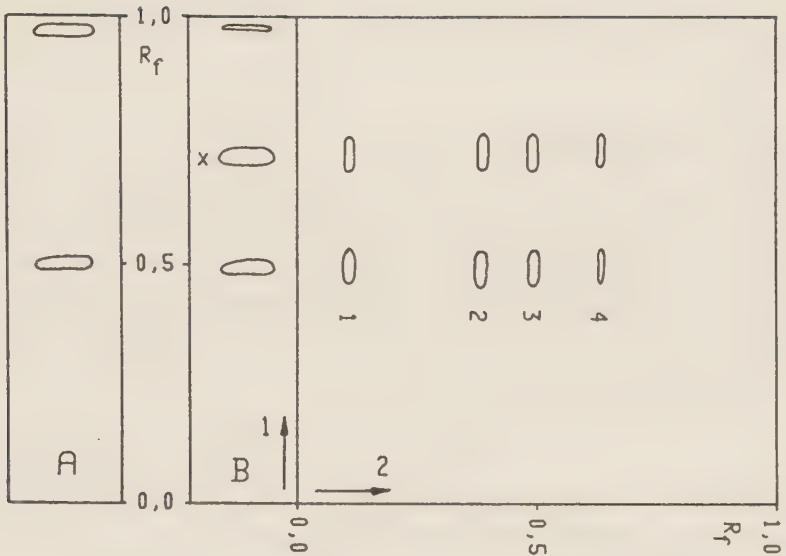


Abb. 21

Zweidimensionale DC des Partialhydrolysates nach Mikrohydrolyse

A = entacyliertes Saponin + Aglykon

B = Partialhydrolysat des entacylierten Saponins
(0.5N TFA, 60 °C)

1 = Glucuronsäure

2 = Galaktose

3 = Arabinose

4 = Glucuronsäurelacton

Fließmittel: Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10)

Adsorbens: HPTLC-Fertigplatten Merck

Detektion: Komarowskys Reagens (Saponin)

Diphenylaminophosphorsäure (Zucker)

Die selektive Abspaltung eines der endständigen Zucker war somit nicht gelungen.

2.6. Zuckerkonfiguration

Um die Konfiguration der Monosaccharide des Dodonaea-Saponins zu bestimmen, wurde ein Protonen-breitbandentkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum aufgenommen.

Im Bereich der anomeren Kohlenstoffe erschienen das Signal für ein C-Atom bei 111.03 ppm und zwei (in der Abbildung zusammenfallende) Signale bei 104.88 ppm und 104.62 ppm.

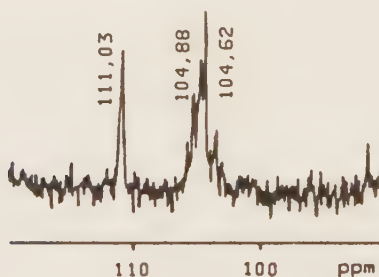


Abb. 22: Anomerenbereich des Protonen-breitbandentkoppelten ^{13}C -NMR-Spektrums des Dodonaea-Saponins

Durch Vergleich mit Literaturwerten von galaktose- bzw. glucuronsäurehaltigen Saponinen (70-72) konnten die beiden Signale bei 104.88 ppm und 104.62 ppm β -gebundener Galakto- bzw. Glucuronopyranose zugeordnet werden. Die chemischen Verschiebungen für α -gebundene Hexosen würden bei höherem Feld (96-100 ppm) liegen. Die β -Konfiguration der Glucuronsäure konnte zusätzlich durch enzymatische Hydrolyse des entacylierten Saponins mit β -Glucuronidase bestätigt werden.

Bezieht man sich auf die Untersuchungen von BESSO (73),

KIMATA (74) und KASAI (75), so dürfte das 3. Signal bei 111.03 ppm einer α -gebundenen Arabinofuranose zuzuordnen sein.

Somit liegen Arabinose α -glykosidisch und Galaktose bzw. Glucuronsäure wie erwartet β -glykosidisch verknüpft vor. Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung von HILLER (29) überein, wonach in Saponinen Arabinose in der Regel der L-Reihe angehört und damit α -glykosidisch gebunden vorliegt, während die Zucker der D-Reihe (Galaktose und Glucuronsäure) meist β -glykosidisch verknüpft sind.

2.7. Zuckerbindungsstelle am Aglykon

Als Verknüpfungsort der Zuckerkette am Aglykon kommt nach HILLER (76) bei uronsäurehaltigen Estersaponinen ausschließlich die 3-Stellung des Triterpengrundgerüsts in Frage.

Zur Beweisführung dieser Annahme wurde das Saponin entacyliert, anschließend nach HAKOMORI (68) permethyliert und die Zucker durch trifluoressigsäure Hydrolyse abgespalten.

Somit lag im Dodonaea-Aglykon die ehemals glykosidierte OH-Gruppe frei vor, während alle übrigen Hydroxylgruppen methyliert sein mußten.

Das Massenspektrum dieser Verbindung zeigte den Molekülpeak bei m/z 576. Es lag demnach ein fünffach methyliertes R_1 -Barrigenol-Derivat vor.

Da das Retro-Diels-Alder-Fragment B (Abb. 23, vgl. weiter Abb. 11, S. 25) ein Massenfragment bei m/z 368 ergab, sollte dieses fünffach methyliert sein.

Somit dürfte die OH-Gruppe in 3-Stellung des Aglykons frei vorliegen und folglich die Bindungsstelle der Zuckerkette darstellen.

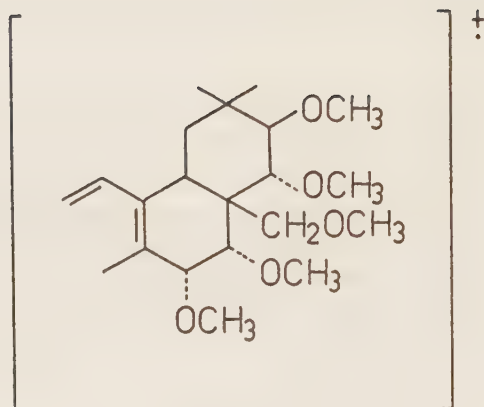


Abb. 23: Permethyliertes Retro-Diels-Alder Fragment des Dodonaea-Aglykons bei m/z 368

Damit ergibt sich für das Desacyl-Hauptsaponin von *Dodonaea viscosa* die Struktur eines R₁-Barrigenol-3-O-β-D-glucuronopyranosids, das in 2- und 3-Stellung der Glucuronsäure durch α-L-Arabinofuranose und β-D-Galaktopyranose substituiert ist (vgl. auch Abb. 40, S. 71/72).

3. Säureteil

Als esterartig an Saponine gebundene organische Säuren wurden bisher die in Tabelle 3 angeführten Vertreter beschrieben.

Tab. 3: Bisher in Saponinen aufgefundene "Estersäuren"

Strukturtyp	"Estersäure"	Literatur
aliphatisch, gesättigt	Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Isobuttersäure, Isovalerian- säure, 2-Methylbuttersäure	(77,78)
aliphatisch, ungesättigt	Angelicasäure, Tiglinsäure, Dimethylacrylsäure, Hexen- (2)-säure, Nonadien-(2,4)- säure	(77,79,80)
aromatisch	Benzoessäure, Ferulasäure, Zimtsäure, p-Methoxyzimt- säure, 3,4-Dimethoxyzimt- säure	(77,81,82)
weitere	Methylanthraniolsäure	(83)
	Cotylinsäure	(84)
	Monoterpencarboxysäure	(85)

3.1. Identifizierung der Acylreste

Zur Abtrennung der organischen Säuren von Estersaponinen werden im allgemeinen Hydrolysen mit verdünntem Alkali durchgeführt. Aus dem alkalischen Hydrolysat können nach dem Ansäuern die Säurekomponenten durch Ausschüttelung mit organischen Lösungsmitteln gewonnen werden.

Die Hydrolyse des Dodonaea-Saponingemisches wurde bei Raumtemperatur mit 0.5N NaOH durchgeführt (siehe IV.1.1.). Nach dem Ansäuern des Hydrolysates mit 50 %iger H_2SO_4 auf pH 1 wurden die aus ihren Natriumsalzen freigesetzten organischen Säuren durch mehrmaliges Ausschütteln mit Ether abgetrennt. Die vereinigten, im N_2 -Strom auf ein kleines Volumen eingeeengten Etherphasen wurden zur Identifizierung der Säuren verwendet.

Während die Identifizierung von aromatischen Säuren in der Regel mit DC-Methoden möglich ist, bereitet hiermit der Nachweis von aliphatischen Säurekomponenten Schwierigkeiten, vor allem, wenn es sich um isomere Verbindungen handelt. Hier ist die gaschromatographische Bestimmung die Methode der Wahl, da sie gleichzeitig Aufschluß über die Mengenverhältnisse gibt.

3.1.1. Gaschromatographische Analyse

Zur GC-Analyse der Säuren des Dodonaea-Saponingemisches wählten wir zunächst eine Diethylhexylsebacinat 25 %/Sebacinsäure-Säule.

Bei isothermer Analyse (145 °C) ließen sich für das Dodonaea-Saponingemisch zwei Säurekomponenten nachweisen. Zum Vergleich wurde ein Testgemisch aus aliphatischen, gesättigten und ungesättigten Säuren (C_2 bis C_6) zusammengestellt. Wie aus Abb. 24 hervorgeht, konnte Peak 1 der Dodonaea-Säuren einer 2-Methyl- bzw. 3-Methylbuttersäure des Testgemisches zugeordnet werden. Da die beiden isomeren Methylbuttersäuren im Gaschromatogramm zusammenfallen, konnte eine endgültige Zuordnung an dieser Stelle noch nicht erfolgen.

Peak 2 war mit keiner der im Testgemisch enthaltenen Säuren identisch. Mit einer Retentionszeit von 19.5 min lag er im Bereich der gesättigten und ungesättigten C_5 -Säuren.

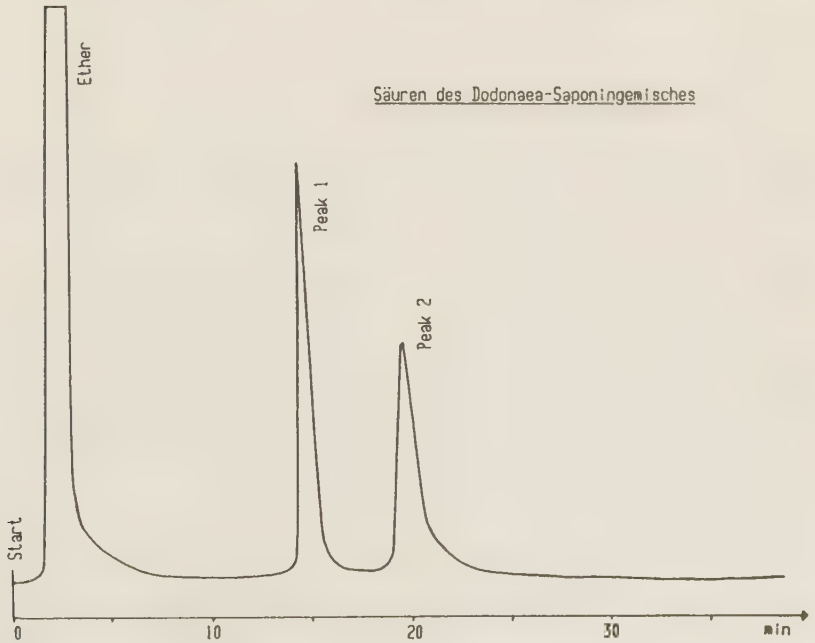
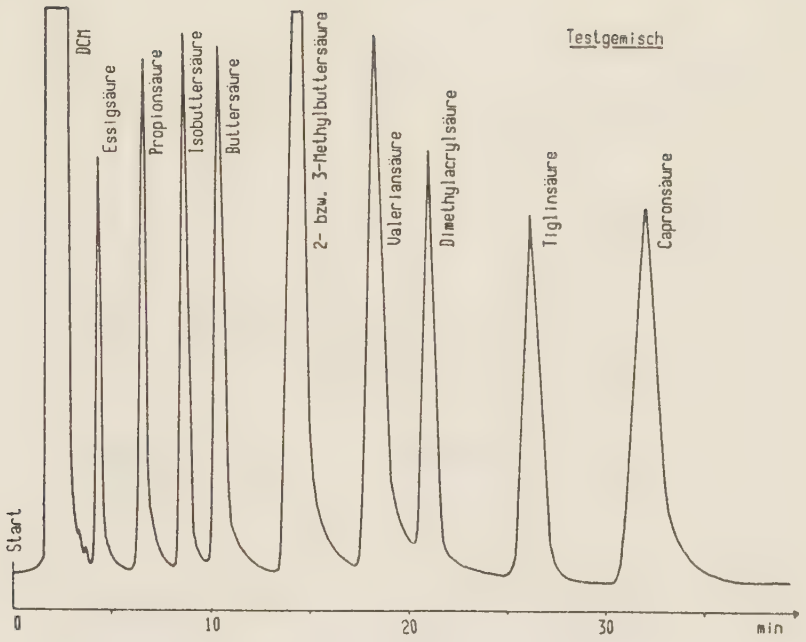


Abb. 24: Gaschromatogramm der Dodonaea-Säuren

C ₅ -Säure:	Retentionszeit:
2(3)-Methylbuttersäure	14,5 min
Valeriansäure	18,5 "
Peak 2	19,5 "
Dimethylacrylsäure	21 "
Tiglinsäure	26,5 "

Als weitere in Estersaponinen vorkommende C₅-Säure wurde die mit Tiglinsäure isomere Angelicasäure beschrieben, die jedoch nicht im Handel erhältlich ist.

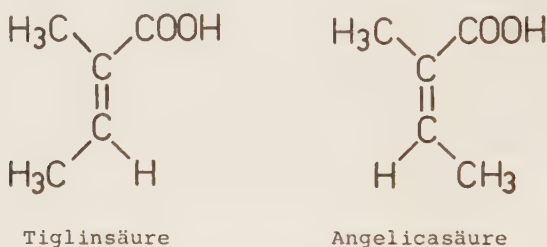


Abb. 25

Als Vergleichssubstanz wählten wir Aescin, in dem von WAGNER (86) in einer GC-Untersuchung Essigsäure, Isobuttersäure, 2-Methylbuttersäure, Angelicasäure und Tiglinsäure nachgewiesen worden waren.

Ein Vergleich mit den Säuren des Dodonaea-Saponingemisches erfolgte nach alkalischer Hydrolyse des Aescins und anschließender Ausschüttelung der Säuren durch gaschromatographische Analyse. Wie Abb. 26 zeigt, konnte Peak 2 des Dodonaea-Säurechromatogramms eindeutig der Angelicasäure zugeordnet werden.

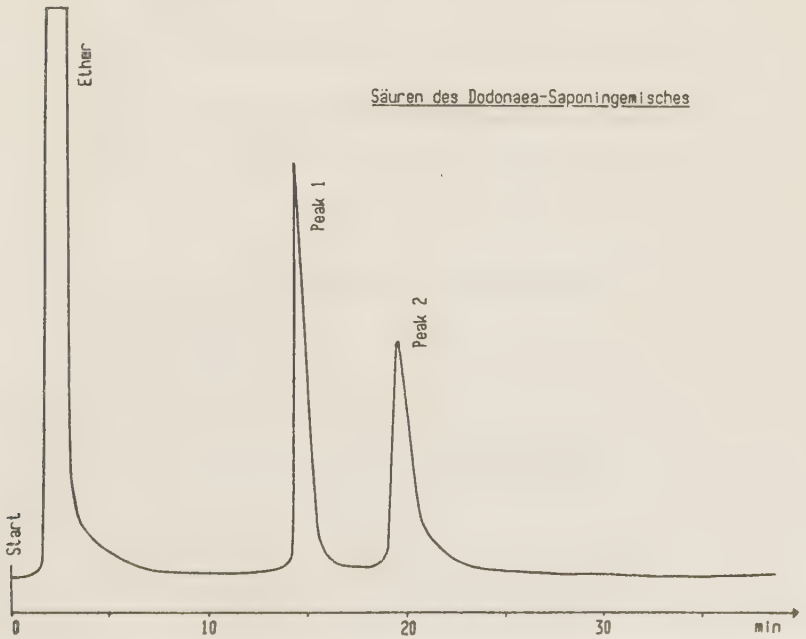
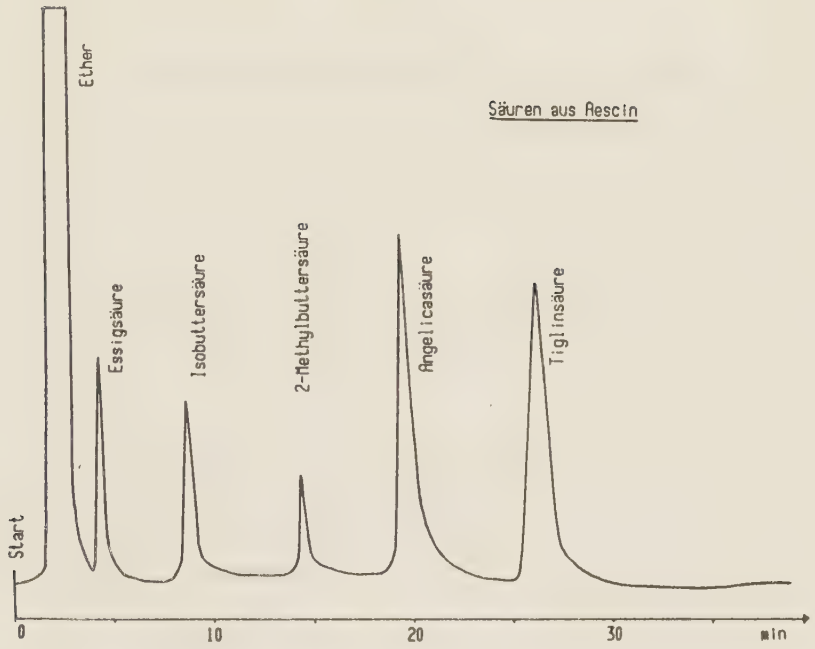


Abb. 26: Gaschromatogramme der Säuren aus Dodonaea und Aescin

3.1.2. Dünnschichtchromatographische Untersuchung

Um nachzuprüfen, ob durch die gaschromatographische Analyse alle Säurekomponenten erfaßt worden waren, wurde das Dodonaea-Säuregemisch zusätzlich einer DC-Untersuchung unterzogen.

Die Entwicklung erfolgte auf Celluloseplatten in NH_3 -gesättigtem Butanol. Bei Detektion mit Methylrot-Indikator pH 9 wurden die organischen Säuren als rote Zonen auf gelbem Untergrund sichtbar.

Wie Abb. 27 zeigt, konnte Methylbuttersäure durch Vergleich mit einer Testsubstanz und Angelicasäure durch Vergleich mit den Säuren aus Aescin zugeordnet werden. In tieferem R_f -Bereich war jedoch noch eine dritte Zone sichtbar, die im DC-Verhalten mit keiner der mitchromatographierten Testsubstanzen übereinstimmte.

Da diese Verbindung bei der gaschromatographischen Analyse nicht erfaßt worden war, könnte es sich entweder um eine schwer flüchtige oder um eine leicht zersetzliche Säure handeln.

Zur Identifizierung der dritten Säurekomponente überprüfen wir die Fragmentierung im FAB-MS-Spektrum des Dodonaea-Hauptsaponins.

3.1.3. FAB-MS des Dodonaea-Hauptsaponins

Im FAB-MS wies das Hauptsaponin den $(M-H)^-$ Molekülpeak bei m/z 1157 auf (Δ MG 1158).

Da für das entacylierte Saponin eine Masse von 976 ermittelt worden war, mußte die Differenz von 182 Masseneinheiten dem Säureteil des Saponins zufallen (Δ MG 218 für die Summe der Säuren).

Als typische, für organische Säuren in Frage kommende Abspaltungen im FAB-MS konnten Differenzen von 82, 84 und 98 Masseneinheiten registriert werden (Tabelle 4).

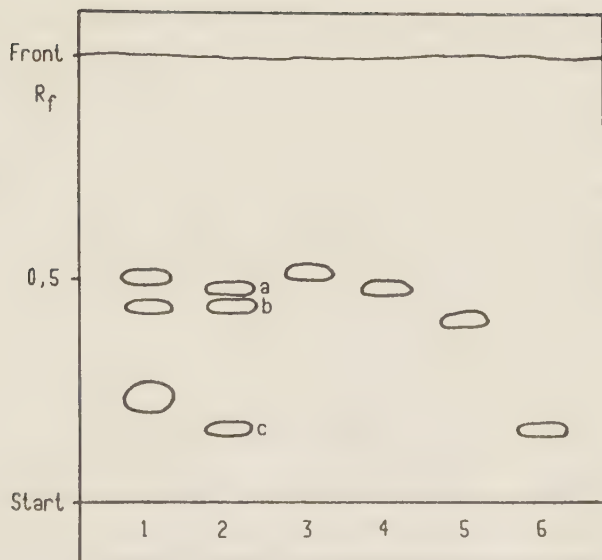


Abb. 27: DC des Dodonaea-Säuregemisches

1 = Dodonaea-Säuregemisch

2 = Säuregemisch aus Aescin

a = Tiglinsäure

b = Angelicasäure

c = Essigsäure

(Isobuttersäure und 2-Methylbuttersäure werden aufgrund der zu geringen Konzentration nicht erfaßt)

3 = 2-Methylbuttersäure

4 = Tiglinsäure

5 = Isobuttersäure

6 = Essigsäure

Fließmittel: Butanol gesättigt mit Ammoniak 25 %

Detektion: Methylrot-Indikator pH 9

Tab. 4: Charakteristische Fragmente des Dodonaea-Hauptsaponins im FAB-MS

m/z	Zuordnung
1157	(M-H) ⁻
1073	(M-H) ⁻ - 84 (Methylbuttersäure)
1059	(M-H) ⁻ - 98 (unbek. Säure)
1041	(M-H) ⁻ - 98 (unbek. Säure) - 18 (H ₂ O)
1025	(M-H) ⁻ - 132 (Pentose)
995	(M-H) ⁻ - 162 (Hexose)
977	(M-H) ⁻ - 162 (Hexose) - 18 (H ₂ O)
	o. (M-H) ⁻ - 98 (unbek. Säure) - 82 (Angelicasäure)
959	(M-H) ⁻ - 162 (Hexose) - 36 (2 H ₂ O)
941	(M-H) ⁻ - 132 (Pentose) - 84 (Methylbuttersäure)

Eine Massendifferenz von 84 ist der Methylbuttersäure (MG 102) zuzuordnen, während die Abspaltung von 82 Masseneinheiten durch Angelicasäure (MG 100) bedingt ist.

Der Verlust von 98 Masseneinheiten weist auf eine Säure mit dem Molekulargewicht 116 hin. Hierfür kämen eine gesättigte C₆-Carbonsäure, eine ungesättigte C₅-Hydroxycarbonsäure, eine C₅-Ketocarbonsäure oder eine epoxidierte C₅-Carbonsäure in Frage.

Das Vorliegen einer gesättigten C₆-Carbonsäure kann schon an dieser Stelle ausgeschlossen werden, da diese bei der GC-Analyse erfaßt worden wäre (vgl. Capronsäure, Abb. 24, S. 47).

Auffallend war, daß das FAB-MS des Dodonaea-Hauptsaponins die Abspaltungen von 3 Säurekomponenten zeigte, während aber der Säureteil des Saponins mit einer Gesamtmasse von 218 nur 2 Säuren zuläßt.

Es war daher zu vermuten, daß das Dodonaea-Hauptsaponin als

Gemisch von zwei Komponenten mit identischem Kohlenhydratteil und Aglykon aber unterschiedlichen Säurekomponenten vorliegt.

Zur Klärung dieses Phänomens sowie zur weiteren Identifizierung der Säuren und der Säurestellung am Aglykon versuchten wir im nächsten Schritt aus dem Dodonaea-Saponin ein zuckerfreies Produkt (Esteraglykon(e)) zu gewinnen. Dieses sollte dann derivatisiert und mit spektroskopischen Methoden untersucht werden.

3.2. Gewinnung der Esteraglykone

Da bei der Hydrolyse von Estersaponinen mit verdünnter Säure Acylwanderungen auftreten können (28, 87), mußte zur Abspaltung des Kohlenhydratteilcs eine schonende Hydrolysemethode gefunden werden.

In der Literatur wurde hierfür mehrfach die enzymatische Spaltung beschrieben (85, 88-90).

3.2.1. Enzymatische Hydrolyse

Ein Vortest auf die enzymatische Hydrolysierbarkeit des Dodonaea-Saponingemisches wurde mit einem nach HUBER (91) gewonnenen Enzymgemisch aus *Helix pomatia* und mit Cellulase aus *Aspergillus niger* durchgeführt.

Hierzu wurde das Dodonaea-Saponingemisch in Acetatpuffer gelöst, mit dem Darminhalt von Weinbergschnecken bzw. Cellulase versetzt und jeweils 3 Tage bei 39 °C inkubiert. Eine Trübung der Lösungen wies auf das Entstehen der lipophilen Estergerine hin. Diese wurden den Hydrolysaten durch Dichlormethanausschüttelung entzogen und dünnschichtchromatographisch untersucht.

Im Laufmittel Dichlormethan-Ethylacetat 65:35 wurde nach

Detektion mit Komarowskys Reagens ein für beide Hydrolysemethoden identisches DC-Bild (Abb. 28) mit zwei Hauptzonen bei R_f 0.5 und 0.55 erhalten.

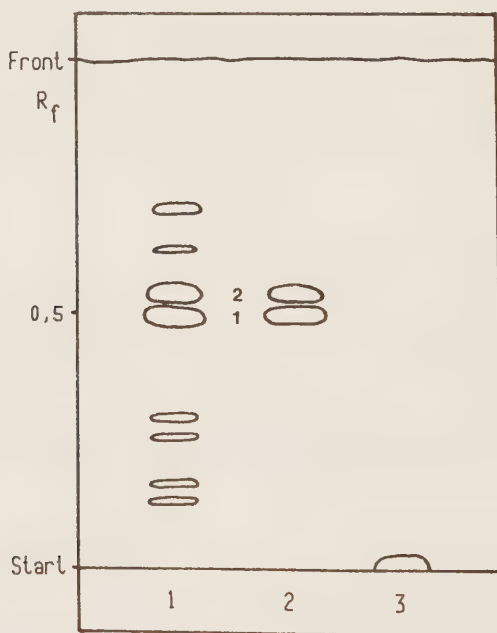


Abb. 28: DC des Dodonaea-Esteraglykongemisches

- 1 = Dodonaea-Saponingemisch nach Hydrolyse mit Cellulase
bzw. dem Enzymgemisch aus Helix pom.
- 2 = Dodonaea-Hauptsaponin nach Hydrolyse mit Cellulase
- 3 = Dodonaea-Aglykon

Fließmittel: Dichlormethan-Ethylacetat (65:35)

Detektion: Komarowskys Reagens

Bei der Hydrolyse des reinen Dodonaea-Hauptsaponins mit Cellulase konnten wie Abb. 28 zeigt, ebenfalls die beiden Hauptzonen erhalten werden. Sie wurden als Esteraglykon 1 (E1) und 2 (E2) bezeichnet.

Damit war bestätigt, daß das Dodonaea-Hauptsaponin - wie vermutet - als Gemisch aus 2 Komponenten vorlag.

Um sicherzugehen, daß die Dodonaea-Esteraglykone keine Zuckerreste mehr enthielten, wurde eine alkalische Hydrolyse mit methanolischer KOH durchgeführt. Da aus dem Hydrolysat dünnenschichtchromatographisch das Dodonaea-Aglykon nachzuweisen war, mußten die Esteraglykone zuckerfrei vorgelegen haben.

3.2.2. Reindarstellung der Esteraglykone

Zur Gewinnung eines Esteraglykongemisches in größerem Maßstab wurde 1 g Dodonaea-Saponingemisch 3 Tage bei 39 °C mit Cellulase inkubiert.

Es wurden 400 mg eines zum Teil noch unvollständig hydrolysierten Esteraglykongemisches erhalten.

Dieses wurde zur Reindarstellung der Esteragenine E1 und E2 durch Säulenchromatographie aufgetrennt.

(Laufmittel: Dichlormethan-Ethylacetat 65:35)

Ausgehend von 400 mg Gemisch konnten 55 mg E1, 33 mg eines Gemisches aus E1 und E2 und 20 mg E2 erhalten werden.

3.2.3. GC-Untersuchung der Esteraglykone

Um den Estergeninen die jeweiligen Säurekomponenten zuzuordnen zu können, hydrolysierten wir die beiden Verbindungen E1 und E2 alkalisch und bestimmten die organischen Säuren durch Gaschromatographie.

Wie Abb. 29 zeigt, konnten für E1 als Säurekomponenten Methylbuttersäure und für E2 Angelicasäure nachgewiesen werden.

Für den Säureteil des Dodonaea-Saponins war aus der Differenz der Molekulargewichte von Saponin und entacyliertem Saponin eine Masse von 182 ermittelt worden ($182 + 2 \text{ H}_2\text{O} = 218$ für die Summe der Säuren).

Demzufolge wäre für die Säurekomponenten von E1 die Zusammensetzung aus Methylbuttersäure (MG 102) und der gaschromatographisch nicht erfaßbaren Säure vom Molekulargewicht 116 denkbar.

Würde sich der Säureteil von E2 analog aus Angelicasäure (MG 100) und einer Säure mit der Masse 116 zusammensetzen, ergäbe dies ein Molekulargewicht von 216 für die Summe der Säuren und somit eine Masse von 1156 für das intakte Saponin.

Da jedoch E1 in mehr als doppelter Menge von E2 vorliegt (vgl. 3.2.2.), ist es erklärbar, daß für das Dodonaea-Saponin entsprechend der Hauptkomponente eine Masse von 1158 ermittelt worden war.

3.3. Acetylierung

Die Acetylierung der Verbindungen E1 und E2 mit Acetanhydrid-Pyridin 1:1 bei Raumtemperatur ergab Triacetate. Die IR-Spektren zeigten eine Hydroxyl-Bande bei 3460 cm^{-1} , während die ^1H -NMR-Spektren Signale für 3 Acetylgruppen bei 2.04 ppm (3H) und 2.08 ppm (6H) aufwiesen.

Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Literaturan-

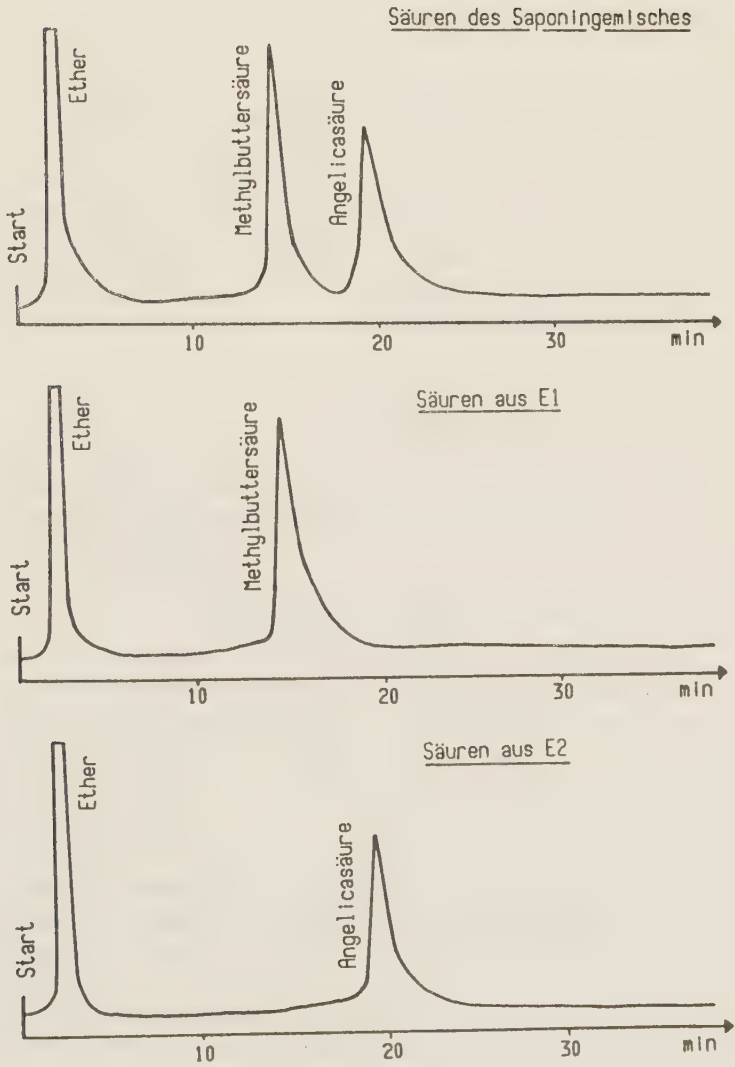


Abb. 29: Gaschromatogramm der Säuren aus Esteraglykon 1 und 2

gaben, wonach bei der Acetylierung von R₁-Barrigenol und dessen Estern unter milden Bedingungen die Hydroxylgruppe an C-16 nicht erfaßt wird (48).

3.4. Darstellung und FAB-MS Analyse der Acetonide

Zur Lokalisation der Säurestellung am Aglykon sowie zur Strukturaufklärung der 3. Säure sollten die Acetonide von Esteraglykon 1, 2 und zum Vergleich von R₁-Barrigenol dargestellt und durch ¹H-NMR-Spektroskopie und FAB-Massenspektrometrie untersucht werden.

Zur Herstellung der Acetonide wählten wir ein von YOSIOKA (92) beschriebenes Verfahren.

Die Proben wurden hierzu in trockenem Aceton unter Zusatz von 0.5 % Dimethoxypropan gelöst. Die Umsetzung erfolgte nach Zusatz von p-Toluolsulfonsäurelösung bei Raumtemperatur.

Bei der DC-Überprüfung der Reaktion war die Entstehung eines lipophileren Produktes zu erwarten.

Abb. 30 bestätigt, daß sowohl aus E1 als auch aus E2 quantitativ Verbindungen mit höheren R_F-Werten entstanden waren. Eine massenspektrometrische Überprüfung der Reaktionsprodukte sollte Auskunft darüber geben, ob es sich tatsächlich um Acetonide von E1 und E2 handelte.

Das FAB-MS des Reaktionsproduktes aus E1 zeigte den (M-H)⁻ Molekülpeak bei m/z 727. Es handelt sich demnach um das Monoacetonid von E1, das mit Methylbuttersäure und der Säure vom Molekulargewicht 116 ("Säure 3") verestert sein muß.

Für das Acetonid von E2 wurde eine Masse von 726 ermittelt, es liegt somit ebenfalls als Monoacetonid vor. Als Säurekomponenten resultieren Angelicasäure und eine Säure mit der Molekülmasse 116, wobei noch ungeklärt ist, ob diese mit der "Säure 3" in Esteraglykon 1 identisch ist.

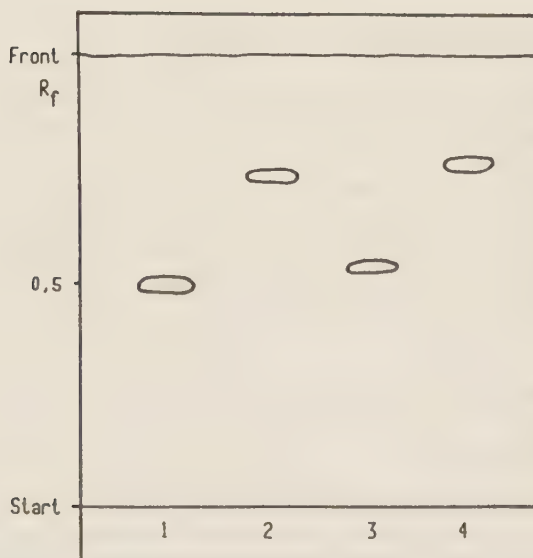


Abb. 30: DC der Acetonide von Esteraglykon 1 und 2

1 = Esteraglykon 1

2 = Acetonid von Esteraglykon 1

3 = Esteraglykon 2

4 = Acetonid von Esteraglykon 2

Fließmittel: Dichlormethan-Ethylacetat (65:35)

Detektion: Komarowskys Reagens

3.5. ^1H -NMR-Untersuchung der Acetonide

3.5.1. Diacetonid des Dodonaea-Aglykons

Das Dodonaea-Aglykon bildete mit Aceton entsprechend den Literaturangaben für R_1 -Barrigenol (93) ein Diacetonid.

Wie aus einem Vergleich der Verschiebungswerte des ^1H -NMR (Abb. 31) mit den in der Literatur beschriebenen Daten (93) hervorgeht, muß ein Isopropyliden-Rest die 15,16-Stellung, der zweite die 22,28-Position des Aglykons einnehmen.

3.5.2. Monoacetonid von Esteraglykon 1 (E1)

Stellung der Säuren

Für die ^1H -NMR-Spektren der Monoacetonide von E1 und E2 war zu erwarten, daß durch die Substitution mit den organischen Säuren (O-CO-Alkyl-Substitution) zwei Wasserstoffsignale eine deutliche Tieffeldverschiebung im Vergleich zum Diacetonid des Aglykons (OH- bzw. O-Alkyl-Substitution) erfahren.

Im ^1H -NMR-Spektrum von E1 (Abb. 32) zeigten die mit 10.1 Hz koppelnden Signale von 21 β -H und 22 α -H verglichen mit den entsprechenden Signalen des R_1 -Barrigenol-Diacetonids (vgl. Abb. 31) eine signifikante Verschiebung zu tieferem Feld um ca. 1.5 ppm.

Die Positionen 21 und 22 des Dodonaea-Aglykons müssen demnach die Verknüpfungsorte der organischen Säuren darstellen.

C(28) H_2OH -Gruppe

Die bei 2.90 und 3.28 ppm auftretenden Signale für die beiden Wasserstoffatome an C-28 zeigten wie aus Abb. 33 hervorgeht, im ^1H -NMR-Spektrum ohne D_2O -Austausch eine deutliche Kopplung mit OH (J ca. 10 Hz). Diese war nach D_2O -Aus-

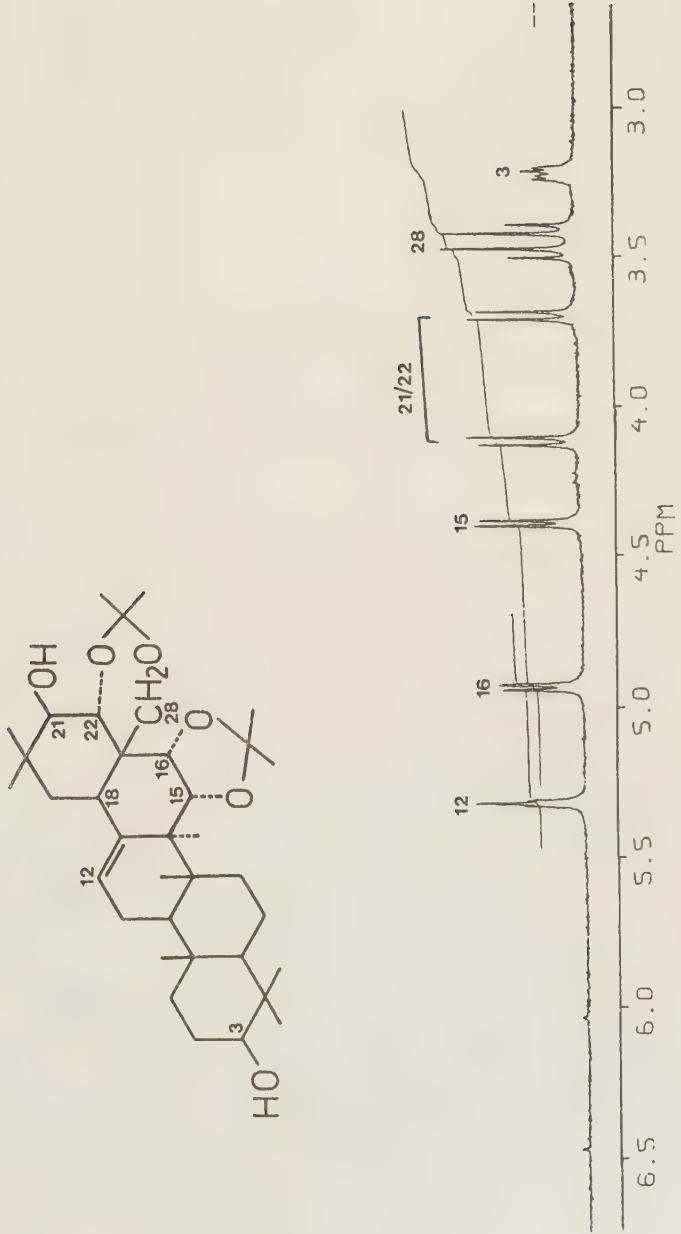


Abb. 31: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum des Diacetons des Dodonaea-Aglykons

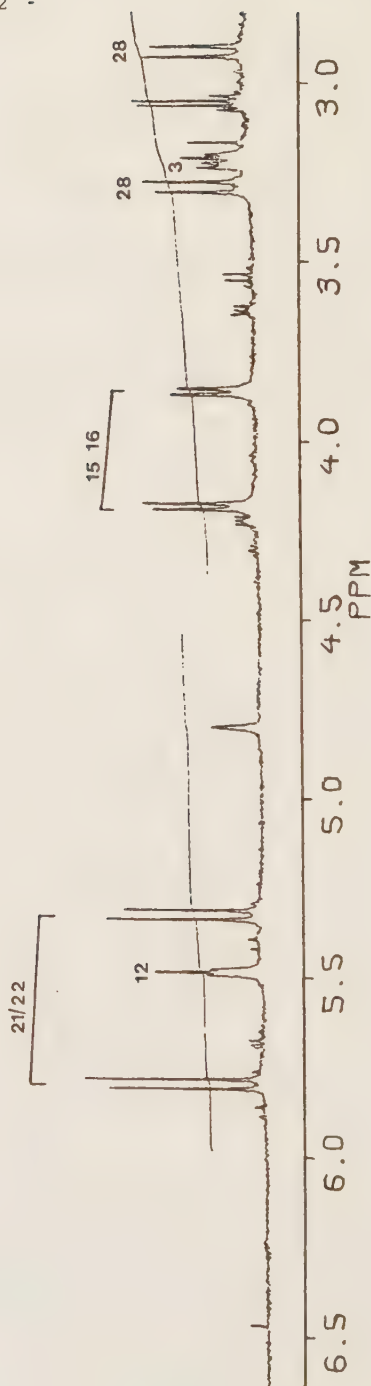
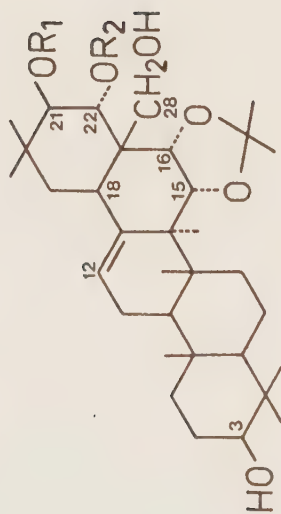


Abb. 32: Ausschnitt aus dem 1H -NMR-Spektrum des Monoacetons von E1 (D_2O -Austausch)

tausch nicht mehr nachweisbar. Somit muß in E1 eine freie CH_2OH -Gruppe vorliegen.

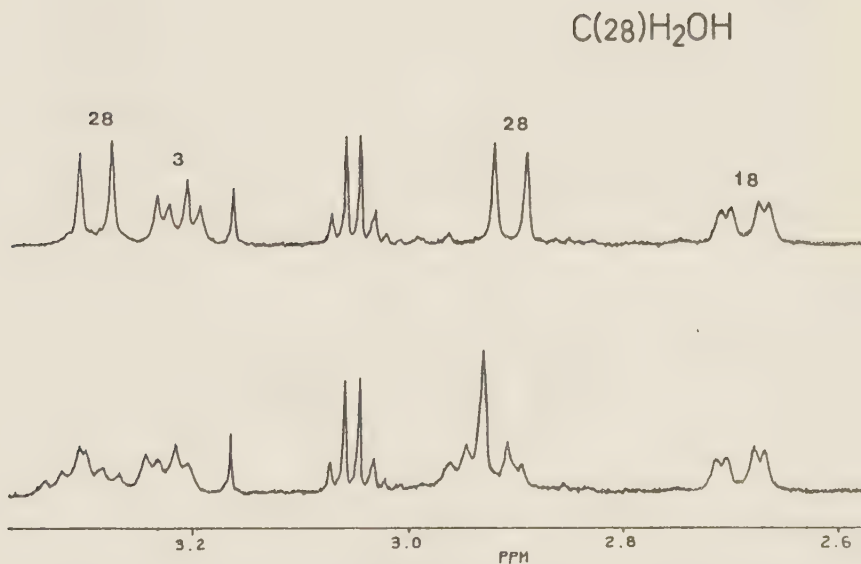


Abb. 33: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum des Monoacetonids von E1

oben: mit D_2O -Austausch
unten: ohne D_2O -Austausch

Isopropyliden-Rest

Nach Ausschluß von C-21, C-22 und C-28 kommen als Bindungsstellen für den Isopropyliden-Rest die Positionen 15 und 16 des Esteraglykons in Frage. Damit stehen auch die für $15\alpha\text{-H}$ und $16\alpha\text{-H}$ gefundenen Verschiebungswerte in Einklang.

Methylbuttersäure

Da es bei der gaschromatographischen Analyse der organischen Säuren nicht möglich war, zwischen den beiden Isomeren 2- und 3-Methylbuttersäure zu unterscheiden, wurden zur eindeutigen Identifizierung die ^1H -NMR-Daten der Methylgruppen herangezogen.

Die Verschiebungswerte der Methylgruppen an C-2 und C-3 (Abb. 34) von 1.17 ppm (3H, d, $J=7$ Hz) und 0.93 ppm (3H, t, $J=7$ Hz) stimmen mit den in der Literatur gefundenen Daten für 2-Methylbuttersäure überein (94).

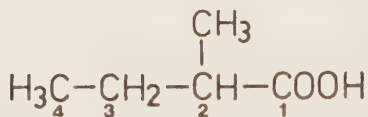


Abb. 34

2-Methylbuttersäure

Beim Vorliegen einer 3-Methylbuttersäure hätten dagegen die Methylgruppen einer $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ -Gruppierung zwei Dubletts liefern müssen, die aufgrund der freien Drehbarkeit gleiche chemische Verschiebungen im ^1H -NMR-Spektrum aufweisen würden.

"Säure 3"

Für "Säure 3" kommen nach den bisherigen Untersuchungen (siehe 3.1.3.) eine ungesättigte C_5 -Hydroxycarbonsäure, eine C_5 -Ketocarbonsäure oder eine C_5 -Epoxy-carbonsäure in Frage.

Da das ^1H -NMR-Spektrum des E1-Acetonids weder Signale für Protonen noch für Methylgruppen an einer Doppelbindung zeigt

te, konnte das Vorliegen einer ungesättigten Hydroxycarbonsäure ausgeschlossen werden.

Dagegen wiesen ein Quartett bei 3.05 ppm (1H, J=5,3 Hz) und ein zugehöriges Dublett (3H) mit der gleichen Kopplungskonstante bei 1.35 ppm auf eine CH₃CH-Gruppierung hin. Da keine weiteren Kopplungen festzustellen waren, mußte diese isoliert vorliegen.

Mit dem vorgegebenen Strukturelement lassen sich sowohl eine C₅-Ketosäure als auch eine C₅-Epoxyssäure formulieren. Eine C₅-Ketosäure mit isolierter CH₃CH-Gruppierung müßte folgende Struktur besitzen:

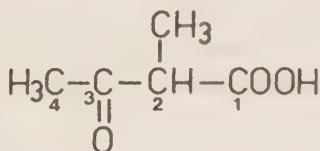


Abb. 35

2-Methylacetessigsäure

In diesem Fall wäre für die Methylgruppe an C-3 ein scharfes Singulett bei etwa 2.1 ppm zu erwarten, das jedoch im ¹H-NMR-Spektrum von E1 nicht auftritt.

Zudem müßte die β-Ketosäure aufgrund der Keto-Enol-Tautomerie eine positive FeCl₃-Reaktion liefern. Wie wir nachweisen konnten, ist dies bei 2-Methylacetessigsäure auch der Fall, nicht jedoch bei "Säure 3" des Esteraglykons.

Für eine C₅-Epoxyssäure mit isolierter CH₃CH-Gruppe läßt sich die in Abb. 36 dargestellte Formulierung ableiten.

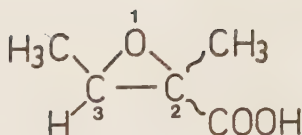


Abb. 36

2,3-Dimethyl-oxiran-2-carbonsäure

Dieser Struktur, die mit den Signalen der CH_3CH -Gruppierung in Einklang steht, müßte ein weiteres Signal für die zweite isolierte Methylgruppe zuzuordnen sein. Für dieses kommt ein bei etwa 1.3 ppm liegendes Singulett im ^1H -NMR des Acetonids von E1 in Frage.

Für die "Säure 3" würde sich somit die Struktur einer bisher in Estersaponinen nicht aufgefundenen 2,3-Dimethyl-oxiran-2-carbonsäure ergeben.

3.5.3. Monoacetonid von Esteraglykon 2 (E2)

Stellung der Säuren

Auch das ^1H -NMR-Spektrum von E2 wies für 21 β -H und 22 α -H zwei zu tieferem Feld verschobene Dubletts bei 5.40 und 5.87 ppm auf (Abb. 37). Wie bei E1 müssen die organischen Säuren somit in 21,22-Position des Aglykons gebunden sein.

C(28) H_2OH -Gruppe

Durch Vergleich der Kopplungen von 28- H_2 vor und nach D_2O -Austausch (Abb. 38) konnte auch für E2 eine freie CH_2OH -Gruppe nachgewiesen werden.

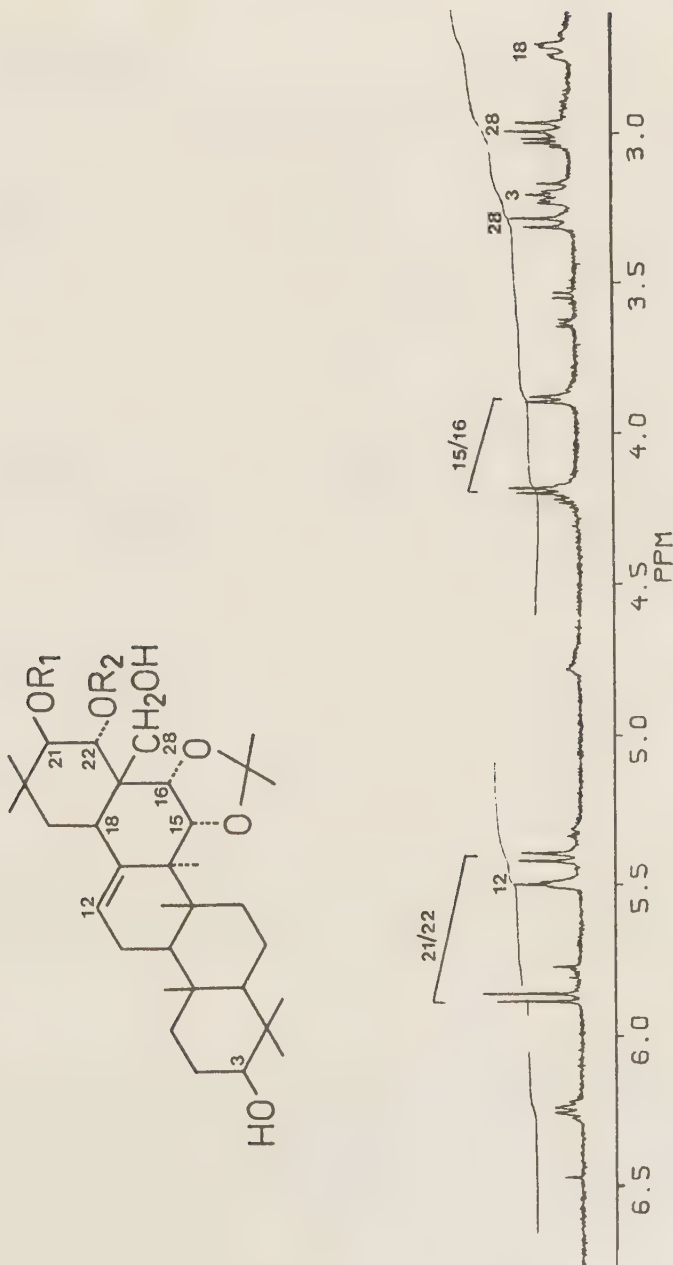


Abb. 37: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum des Monoacetons von E2 (D_2O -Austausch)

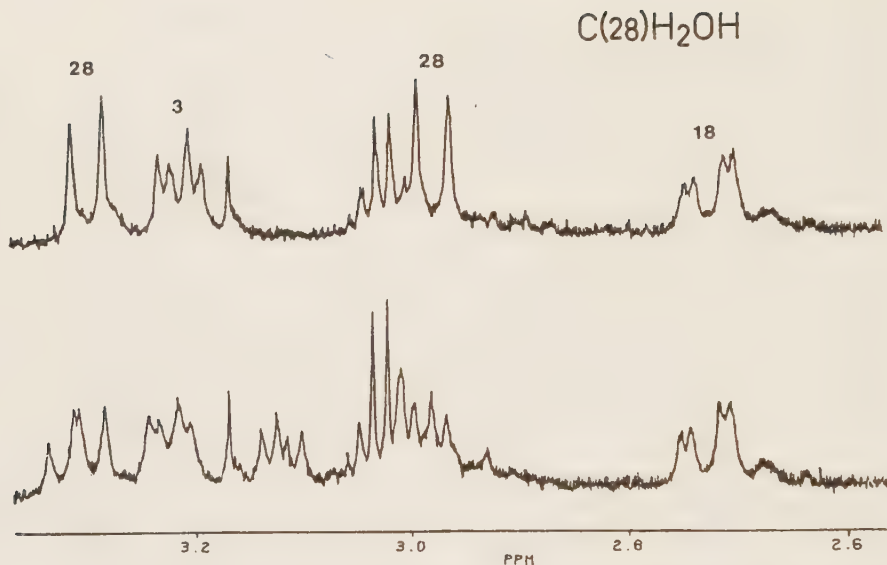


Abb. 38: Ausschnitt aus dem 1H -NMR-Spektrum des Monoacetonids von E2

oben: mit D_2O -Austausch

unten: ohne D_2O -Austausch

Isopropyliden-Rest

Wie bei E1 verblieben als Verknüpfungsorte für den Isopropyliden-Rest die 15,16-Stellung des Aglykons, bestätigt durch die bei 3.89 und 4.19 ppm auftretenden Signale der 15α - und 16α -Wasserstoffe.

Angelicasäure

In Übereinstimmung mit den Werten der Literatur (94) liefert das olefinische Proton der Angelicasäure ein Quartett bei 6.24 ppm. Die hiermit koppelnde Methylgruppe erscheint als Dublett bei 2.02 ppm, während die isolierte Methylgruppe ein Singulett bei 1.85 ppm ergibt.

"Säure 3"

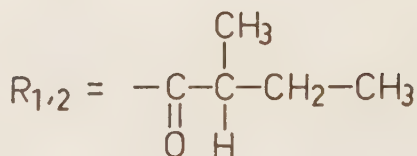
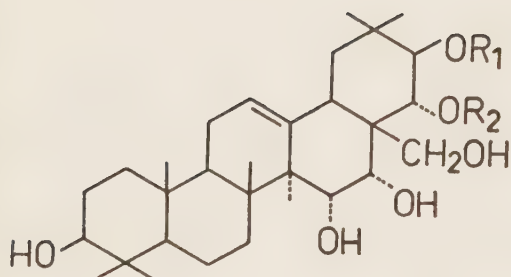
Die zweite Säurekomponente des Esteraglykon 2 liefert im ^1H -NMR-Spektrum die gleichen Signale wie "Säure 3" des Esteraglykon 1.

Der isolierten CH_3CH -Gruppe sind ein Quartett bei 3.03 ppm (1H, $J=5.3$ Hz) und ein Dublett bei 1.31 ppm (3H, $J=5.3$ Hz) zuzuordnen.

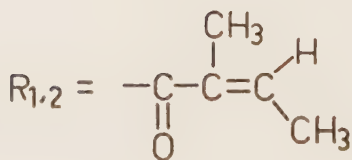
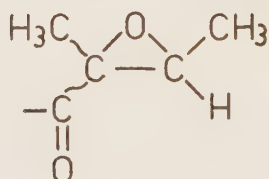
Ebenso tritt bei etwa 1.3 ppm ein Singulett (3H) auf, das einer zweiten isolierten Methylgruppe der vorgeschlagenen 2,3-Dimethyl-oxiran-2-carbonsäure entsprechen könnte.

Die zweite Säurekomponente des Esteraglykon 2 erweist sich demnach als identisch mit "Säure 3" in E1.

Für die beiden Esteraglykone des Dodonaea-Hauptsaponins werden die in Abb. 39 dargestellten Strukturen vorgeschlagen.



ESTERAGLYKON 1:



ESTERAGLYKON 2:

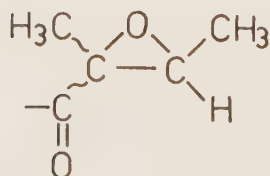
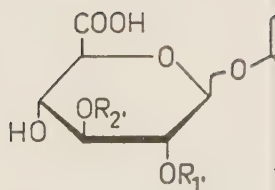
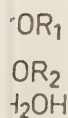
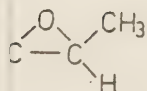
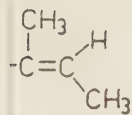
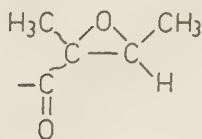
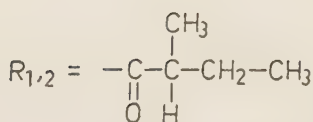


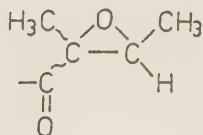
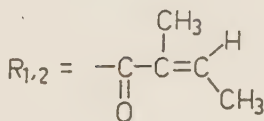
Abb. 39: Esteraglykon 1 und 2 des Dodonaea-Hauptsaponins



$R_{1,2} = \text{Ara (f)}$
 Gal (p)

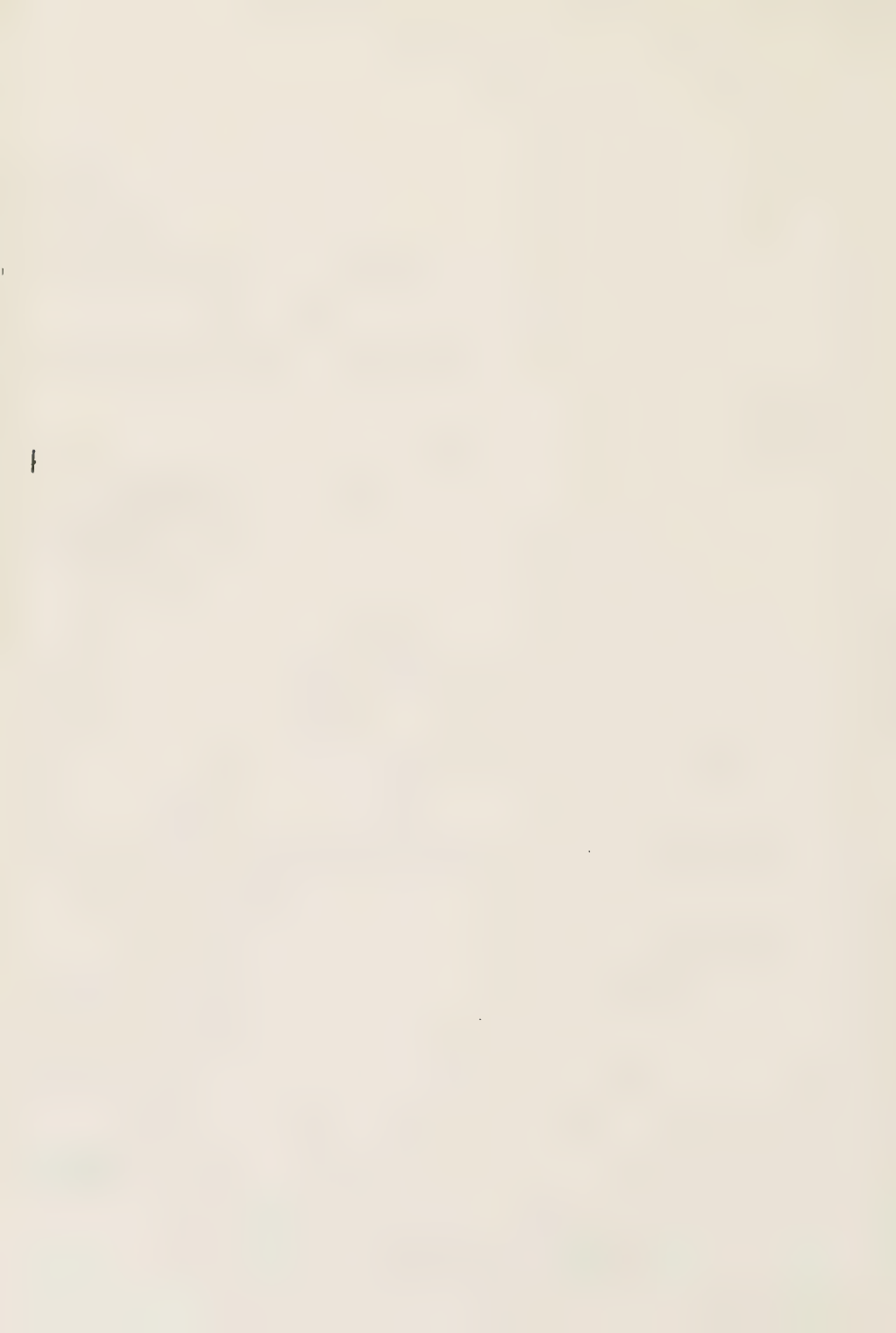


ESTERAGLYKON 1



ESTERAGLYKON 2

Abb. 40: Abbau des Do
alkalische



Verbreitung von Saponinen vom Typ des Dodonaea-Hauptsaponins

Die Gruppe der Estersaponine ist im Pflanzenreich weit verbreitet. Der Grund für die geringe Anzahl von strukturell geklärten Verbindungen liegt sowohl im komplexen Aufbau sowie an der Schwierigkeit der Reingewinnung der Saponine (25). Als erste wiesen WULFF und TSCHESCHE (28) auf einen besonderen Strukturtyp hin, der aus einem hochhydroxylierten Aglykon besteht, das an den Hydroxyl-Gruppen der C-Atome 21 und 22 verestert ist und in dem die Zuckerkette immer über eine Glucuronsäure als geninständigen Zucker gebunden ist. Diesem Saponintyp gehört auch das aus *Dodonaea viscosa* isolierte Hauptsaponin an, wobei sowohl die Struktur des Kohlenhydrateiles als auch eine 2,3-Dimethyloxiran-2-carbonsäure bisher in Estersaponinen noch nicht beschrieben wurden.

V. Charakterisierung der Saponine aus Schefflera venulosa
(Wight et Arn.) Harms

1. Systematik und Herkunft der Droge

Schefflera venulosa gehört zur Gattung Schefflera in der Familie der Araliaceae (95).

Die exakte Bezeichnung lautet: Schefflera venulosa (Wight et Arn.) Harms, Engl. u. Prantl, Natürl. Pfl. Fam. 3, 8 (1894). In der botanischen Literatur gelten Paratropia venulosa Wight et Arn., Prodr. Fl. Pens. Orient. (1834) als Basionym und Heptapleurum venulosum Seem. (1865) als Synonym für die Pflanze.

Bei Schefflera-Arten handelt es sich um immergrüne Bäume oder Sträucher, die in tropischen Gebieten der ganzen Welt verbreitet sind (5,1,96).

2. Isolierung eines Saponingemisches

Ein chemotaxonomisches Merkmal der Araliaceen-Familie ist das Vorkommen von Saponinen (95). Über das Vorkommen von Saponinen wurde auch bei Schefflera-Arten mehrfach berichtet (95, 97, 98).

In ersten orientierenden Versuchen mit dem Extrakt fanden wir diesen Hinweis durch eine positive Schüttelschaumprobe bestätigt.

Zur Gewinnung eines Saponingemisches suspendierten wir den alkoholischen Schefflera-Extrakt in Wasser und schüttelten zur Entfernung des Chlorophylls mehrmals mit Petrolether und Dichlormethan aus. Die Saponine wurden der Wasserphase durch Ausschüttelung mit wassergesättigtem Butanol entzogen. Die zur Trockene eingeeengten Butanolphasen wurden in wenig

Methanol aufgenommen und mit Ether gefällt. Nach Behandeln des Niederschlages mit Aktivkohle und erneuter Etherfällung verblieben 2.2 g eines weißgelben, voluminösen Pulvers (= 7.3 % des Ethanolextraktes).

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung im System Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10) zeigte im R_f -Bereich von 0.4-0.8 zahlreiche Komarowsky-positive Zonen (Abb. 41).

Die drei Hauptzonen mit den R_f -Werten von 0.7, 0.6 und 0.45 wurden mit A, B und C bezeichnet.

Bei Besprühen mit Blutkörperchensuspension erwiesen sich Zone A als stark und Zone C als schwach hämolysierend, während die Verbindung B hiermit nicht detektiert werden konnte.

Da Zone B nach alkalischer Hydrolyse mit 0.5N NaOH dünnschichtchromatographisch nicht mehr nachweisbar war, könnte das Vorliegen eines Bidesmosides oder Estersaponins diskutiert werden.

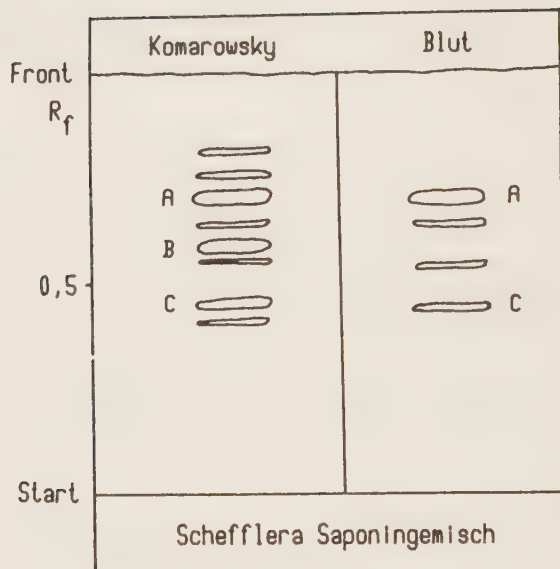


Abb. 41

Dünnschichtchromatogramm des Schefflera-Saponingemisches

Fließmittel: Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10)

Adsorbens: HPTLC-Fertigplatten Merck

Detektion: Komarowskys Reagens
Blutkörperchensuspension

3. Hydrolyse und Charakterisierung der Aglykone

Zur Identifizierung der Aglykone des Schefflera-Saponingemisches wurde zunächst eine saure Hydrolyse mit 10 %iger methanolischer HCl durchgeführt. Nach zweistündigem Erhitzen unter Rückfluß wurde das Hydrolysat mit Wasser verdünnt und mit Dichlormethan ausgeschüttelt.

Parallel dazu versuchten wir auch die Abspaltung der Zucker durch enzymatische Hydrolyse.

Da aus der qualitativen Zuckeranalyse das Vorliegen von Glucuronsäure bekannt war und diese in der Regel geninständig ist, bot sich die Hydrolyse mit β -Glucuronidase an.

Das Saponingemisch wurde in Acetatpuffer bei 30 °C 3 Tage inkubiert. Eine Trübung der Lösung wies auf das Entstehen lipophilerer Verbindungen durch Zuckerabspaltung hin. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Ausschüttelung mit Dichlormethan abgetrennt.

Zur Dünnschichtchromatographie wurden die vereinigten und eingeeengten Dichlormethanphasen der beiden Hydrolysate verwendet.

Als Vergleichssubstanzen dienten die in den Araliaceen häufig vorkommenden Triterpensapogenine Oleanolsäure und Hederagenin sowie die in Schefflera capitata aufgefundene Echinocystsäure (97).

Wie Abb. 42 zeigt, führten die enzymatische und die saure Hydrolyse zu Geningemischen gleicher Zusammensetzung. Die Hydrolysate wiesen im Laufmittel Toluol-Aceton (8:2) zwei Hauptzonen vom R_f 0.45 und 0.5 auf, die als Aglykon 1 und 2 bezeichnet werden.

Aglykon 1 stimmte im chromatographischen Verhalten mit Oleanolsäure überein, während Aglykon 2 ein etwas lipophileres Laufverhalten zeigte.

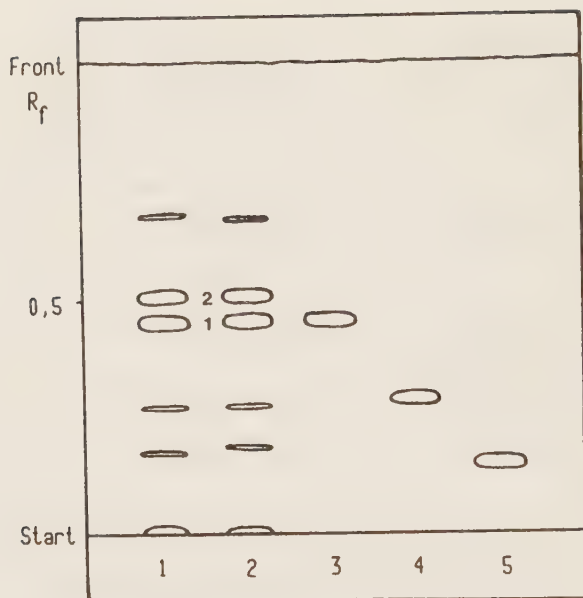


Abb. 42

DC-Untersuchung der Schefflera-Aglykone

- 1 = Aglykone nach salzsaurer Hydrolyse
- 2 = Aglykone nach enzymatischer Hydrolyse
- 3 = Oleanolsäure
- 4 = Echinocystsäure
- 5 = Hederagenin

Fließmittel: Toluol-Aceton (8:2)

Detektion: Komarowskys Reagens

Zur Reindarstellung der beiden Aglykone wurde die Dichlormethanausschüttelung durch präparative DC aufgetrennt. Ausgehend von 25 mg Aglykongemisch konnten 6 mg Aglykon 1 und 5 mg Aglykon 2 in reiner Form erhalten werden.

Aglykon 1 erwies sich sowohl im Schmelzpunkt als auch im IR-Spektrum (Abb. 43) und der Fragmentierung im Massenspektrum (MG 456) mit Oleanolsäure identisch.

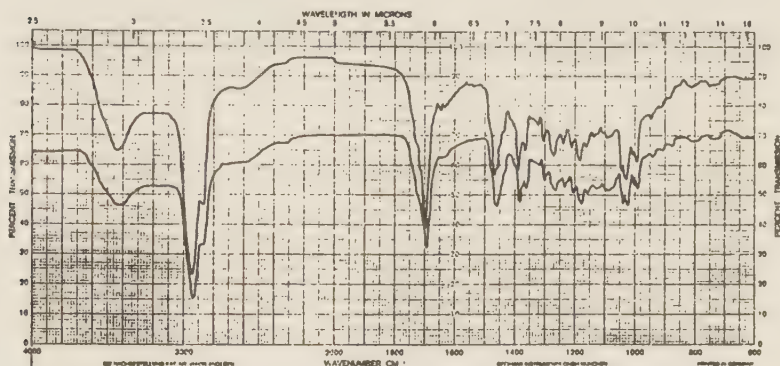


Abb. 43

IR-Überlagerungsspektrum von Schefflera-Aglykon 1 (unten)
mit Oleanolsäure (oben)

Wie Oleanolsäure zeigte auch das Aglykon 2 im MS den Molekülpeak bei m/z 456.

Fragmente bei m/z 248, 207, 203 (248 - COOH) und 189 (207 - H₂O) wiesen auf die Retro-Diels-Alder-Fragmentierung einer pentacyclischen Monohydroxytriterpensäure hin. In Übereinstimmung dazu zeigte das IR-Spektrum (Abb. 44) eine OH-Bande bei 3450 cm^{-1} und eine COOH-Bande bei 1690 cm^{-1} .

Nach den vorliegenden Ergebnissen dürfte es sich bei Aglykon 2 um ein Isomeres der Oleanolsäure handeln.

Als Konstitutionsisomere der Oleanolsäure werden in der Literatur Morolsäure und Betulinsäure beschrieben (99).

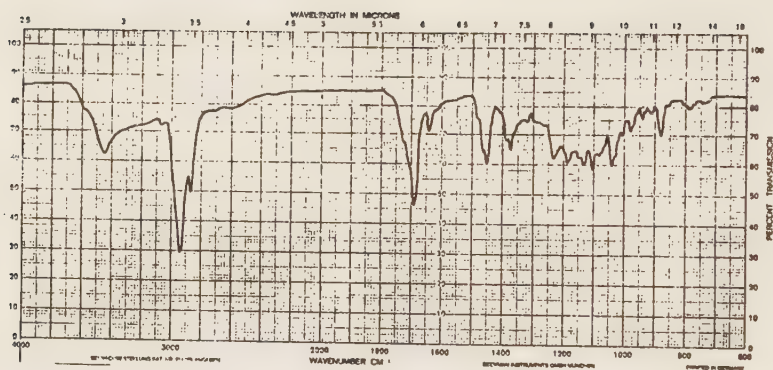


Abb. 44
IR-Spektrum von Schefflera-Aglykon 2

4. Qualitative und quantitative Analyse der Zucker

Zur Analyse der Monosaccharid-Komponenten wurde das Saponin-gemisch mit Trifluoressigsäure hydrolysiert.

Bei DC-Untersuchung des Hydrolysates wurden nach Detektion mit Diphenylaminophosphorsäure-Reagens Glucose, Glucuronsäurelacton (aus Glucuronsäure), Arabinose, Xylose und Spuren von Rhamnose identifiziert.

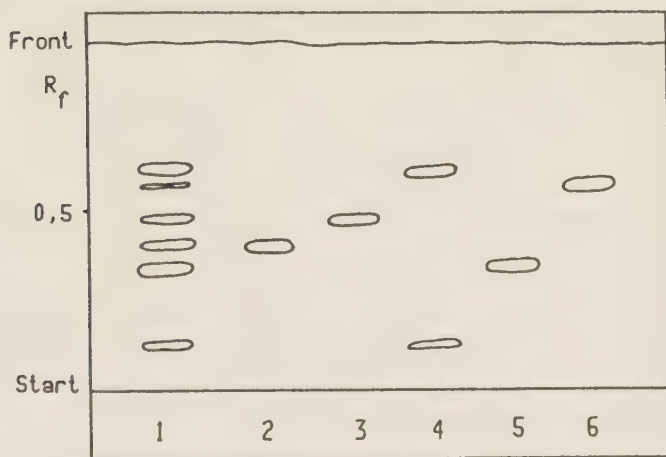


Abb. 45

Zuckerchromatogramm des Schefflera-Saponingemisches

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| 1 = TFA-Hydrolysat | 4 = Glucuronsäurelacton |
| 2 = Arabinose | 5 = Glucose |
| 3 = Xylose | 6 = Rhamnose |

Fließmittel: Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10)

Adsorbens: HPTLC-Fertigplatten Merck

Detektion: Diphenylaminophosphorsäurereagens

Zur quantitativen Bestimmung der Zucker wurden diese in ihre Alditolacetate überführt und gaschromatographisch bestimmt.

Da bei der Analyse ein Saponingemisch vorgelegen hatte, war eine Aussage über die Molverhältnisse der Zucker nicht möglich. Außerdem erhält man durch partielle Reduktion von Glucuronsäure zu Glucose bei der Herstellung der Alditolacetate erhöhte Glucosewerte.

Aus dem Gaschromatogramm (Abb. 46) war jedoch zu ersehen, daß die Pentosen Arabinose und Xylose in etwa gleichen Anteilen vorliegen dürften.

Mit der etwa 3 1/2fachen Menge von Arabinose bzw. Xylose machte Glucose den größten Anteil des Zuckergemisches aus, während Rhamnose nur in geringen Mengen vorlag.

Aufgrund des DC-Verhaltens der Schefflera-Saponine im System Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10) könnte es sich um Glykoside mit 3-5 Zuckermolekülen handeln.

Zieht man die Ergebnisse der quantitativen Zuckeranalyse hinzu, so wäre eine Zusammensetzung des Kohlenhydratteiles der Saponine aus 1 Mol Pentose und 2-4 Mol Glucose bzw. Glucuronsäure zu diskutieren.

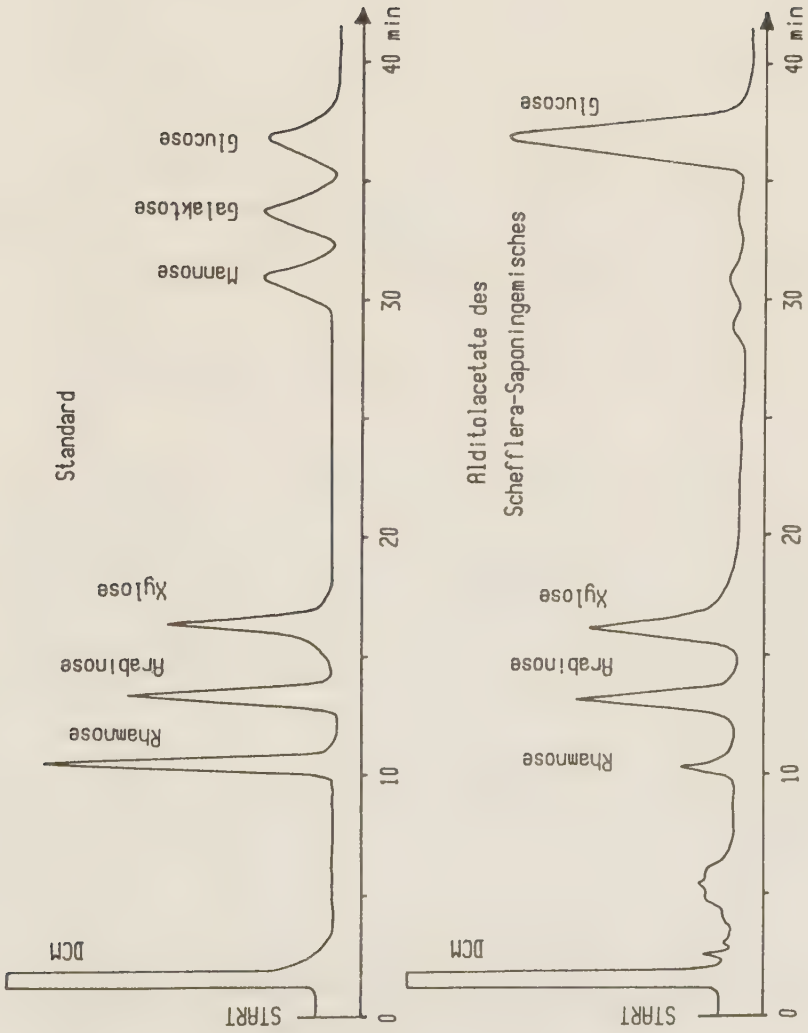


Abb. 46: Gaschromatogramm der Alditolacetate

VI. Pharmakologische Untersuchungen

Für eine Reihe von Saponindrogen wird in der Literatur über eine antiexsudative Wirksamkeit berichtet (Lit. siehe Tabelle 5). Das Aescin aus *Aesculus hippocastanum* war das erste Saponin, das in der Therapie zur Ödembehandlung eingesetzt wurde (100).

In Tabelle 5 sind weitere saponinhaltige Drogen aufgeführt, denen antiexsudative Eigenschaften zugeschrieben werden.

Bei Betrachtung des Strukturtyps der Saponine fällt auf, daß es sich in der Mehrzahl der Fälle um komplexe Glykosidgemische handelt, deren Aglykone stark hydroxylierte, zum Teil mit organischen Säuren veresterte Triterpenalkohole oder -säuren darstellen.

Die Vermutung lag somit nahe, daß auch das Dodonaea-Saponingemisch eine antiexsudative Wirksamkeit besitzen könnte.

1. Viscarin-Carrageenin-Ödem-Test (101)

Der Viscarin-Carrageenin-Ödem-Test an Rattenpfoten stellt ein Modell dar, mit dem es möglich ist, eine exsudative Entzündung zu provozieren und Inhibitorwirkungen zu messen.

Die Entzündung wird durch Injektion eines Irritans in die Rattenpfote hervorgerufen. Aus der Differenz des Pfotenvolumens vor und nach der Provokation kann das Maß der Exsudation ermittelt werden.

Bei der Testung des Dodonaea-Saponingemisches auf antiexsudative Wirksamkeit diente Natriumaescinat als Referenzsubstanz.

Auswertung

Wie aus Tabelle 6 zu ersehen ist, zeigte das Dodonaea-Saponingemisch bei Applikation 16-18 h vor Ödemprovokation dosisabhängig schwache bis starke Ödemhemmung. Seine Wirksamkeit war mit der des Natriumaescinats vergleichbar, allerdings erwies sich die Gewebeverträglichkeit als geringer.

Tab. 5: Antiexsudativ wirksame Saponindrogen

Pflanze	Strukturtyp der Aglykone	Trivialnamen	Literatur
<i>Thea sinensis</i> L.	mehrfach hydroxylierte Triterpenalkohole, mit organischen Säuren verestert	Theasapogenole, Camel- liagenine, Barrington- genol C	(102)
<i>Sanicula europaea</i> L.	"	A ₁ ⁻ , R ₁ -Barrigenol	(103,48)
<i>Eryngium planum</i> L.	"	A ₁ ⁻ , R ₁ -Barrigenol, Barringtongenol C, Erynginole, Camellia- genin A	(103,104,105)
<i>Hydrocotyle vulgaris</i> L.	"	R ₁ -Barrigenol	(106,84)
<i>Polemium caeruleum</i> L.	"	A ₁ ⁻ , R ₁ -Barrigenol, Camelligenin E	(106,78)
<i>Bupleurum falcatum</i> L.	mehrfach hydroxylierte Triterpenalkohole	Saikogenine	(41)
<i>Solidago virgaurea</i> L.	ein- bis mehrfach hydroxy- lierte Triterpensäuren	Oleanolsäure, Polygalasäure	(106,107)
<i>Platycodon grandiflorum</i> A.DC.	mehrfach hydroxylierte Triterpensäuren	Platycodigenin, Polygalasäure, Platycogensäuren	(108,44)
<i>Sapindus mukorossi</i> GAERTN.	zweifach hydroxylierte Triterpensäure	Hederagenin	(109)
<i>Hedera helix</i> L.	zweifach hydroxylierte Triterpensäure	Hederagenin	(110)
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	hydroxylierte Ketotriterpensäure	Glycyrrhetinsäure	(111)
<i>Ruscus aculeatus</i> L.	Steroidsapogenin	Ruscogenin	(112)

Tab. 6: Prozentuale Ödemhemmung des Dodonaea-Saponin-
gemisches und des Natriumaescinats

Substanz	Dosis/kg (mg/5ml)	Applikation h vor / h nach Ödemprovokation	Meßzeit	Ödem- hemmung in %
Dodonaea Saponin- gemisch	0.5	18	3	7.7
			5	6.1
			24	3.0
	*0.7	18	3	33.1
			5	32.1
			24	27.1
	*1.0	16	3	54.5
			5	55.2
			7	58.0
			24	48.7
Natrium- aescinat	0.7	16	3	31.9
			5	33.1
			7	36.2
			24	31.2

* Bei der Dosis von 0.7mg/5ml starb eine von 10 Ratten,
bei der Dosis von 1.0mg/5ml starben 4 von 19 Ratten
innerhalb von 8 Tagen

2. Granulocyten-Test und Chemoluminiszenz-Test

In den letzten Jahren sind saponinhaltige Drogen vermehrt auch Gegenstand immunologischer Untersuchungen gewesen.

Diesen Untersuchungen lag die volksmedizinische Verwendung bestimmter Saponindrogen zur Behandlung von chronischen Infektionskrankheiten, als "Blutreinigungsmittel", bei Ekzemen und anderen Hautkrankheiten, sowie bei Rheuma und Gicht zugrunde (113, 114).

Da Saponine abhängig von der Applikationsart Entzündungen hervorrufen können, ist es wahrscheinlich, daß ihre Wirkung auf einen unspezifischen Reiz zurückzuführen ist. Über diesen Gegenreiz (Counter-Irritation) kann eine Aktivierung des unspezifischen Abwehrsystems erfolgen (113).

Zu den immunologisch interessanten Drogen zählen Panax ginseng (115), Acanthopanax senticosus (116), Albizia lebbeck (117), Guajacum officinale (113), Quillaja saponaria (118), Smilax regelii (119), Cynanchum caudatum (120) sowie Aralia mandschurica (121).

In den meisten Fällen ist für die Wirkung eine Steigerung der unspezifischen Immunabwehr verantwortlich. Es wird diskutiert, daß den Saponinen aufgrund ihrer Oberflächenaktivität die Rolle eines Immunadjuvans zukommt.

Da auch für *Dodonaea viscosa* aus der Literatur eine volksmedizinische Anwendung bei Rheuma und Gicht bekannt ist (3), sollte das Saponingemisch auf immunologische Wirksamkeit geprüft werden.

Für unsere Untersuchungen wählten wir den Granulocyten-Test, modifiziert nach BRANDT (122). Er stellt ein in vitro Modell für die Beeinflussung der Phagocytose dar, die eine bedeutende Rolle in der unspezifischen Immunabwehr einnimmt. Das Prinzip der Methode besteht darin, daß die Phagocytose von Hefezellen durch eine aus Humanserum gewonnene Granulocytenfraktion im mikroskopischen Ausstrichverfahren gemessen wird.

(Durchführung siehe Exp. Teil VI.2.).

Der Grad der Phagocytosesteigerung wird in Prozent oder als Phagocytoseindex angegeben (siehe Exp. Teil VI.2.).

Tab. 8: Prozentuale Phagocytosesteigerung des Dodonaea-Saponingemisches im Granulocyten-Test

Substanz	Konzentration (mg/ml)	Phagocytosesteigerung in %	
		1. Messung	2. Messung
Dodonaea	0.1	6.3	9.1
gereinigtes	0.01	22.9	25.7
Saponingemisch	0.001	8.5	13.0
	0.0001	2.8	8.5
Dodonaea	0.1	-	7.0
Fraktion D der	0.01	9.5	12.7
DCCC-Trennung	0.001	25.7	23.9
	0.0001	8.8	9.5

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, zeigten sowohl das Dodonaea-Saponingemisch als auch die Fraktion D der DCCC-Trennung ein Maximum der Phagocytosesteigerung bei etwa 25 Prozent.

Die Konzentrationen mit der stärksten Phagocytosesteigerung lagen für das Dodonaea-Saponingemisch bei 10^{-2} mg/ml und für Fraktion D bei 10^{-3} mg/ml.

Nachdem sich das Saponingemisch aus Dodonaea im Granulocyten-Test als wirksam erwiesen hatte, wurde als zweiter in vitro Test eine Chemoluminiszenzmessung von phagocytierenden Zellen angeschlossen.

Chemoluminiszenz-Test mod. nach ALLEN (123)

Das Auftreten von Chemoluminiszenz bei der Phagocytose beruht auf der Reaktion von aktivierten Sauerstoffmolekülen mit dem Zellwandmaterial von Mikroorganismen. Die hierbei erhaltene Lichtausbeute kann durch Zusatz von leicht oxidierbaren Substanzen wie Luminol oder Lucigenin verstärkt und durch Photonen-zählung mit Hilfe von Photomultipliern quantitativ ausgewertet werden.

Wir verwendeten als phagocytierende Zellen Granulocyten aus peripherem Blut. Zur Aktivierung der Granulocyten setzten wir opsoniertes Zymosan und zur Steigerung der Lichtausbeute Lucigenin zu.

Das Dodonaea-Saponingemisch wurde in Konzentrationen von 10^{-1} bis 10^{-4} g/100 ml getestet. Bei einer Konzentration von 10^{-2} g/100 ml bewirkte es die größte Steigerung der Chemoluminiszenz von durchschnittlich 67 % (Abb. 47).

Diese war jedoch Zymosan- also Phagocytose-unabhängig und muß somit auf einem anderen, noch nicht geklärten Wirkungsmechanismus beruhen.

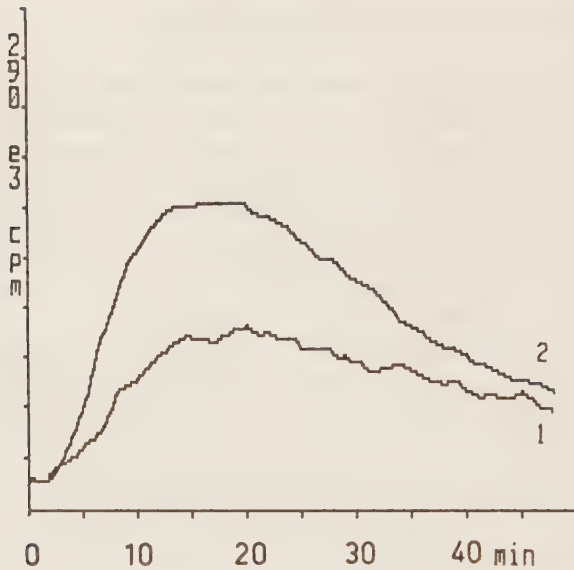


Abb. 47

Chemoluminiszenzsteigerung des Dodonaea-Saponingemisches

1 = Gemittelte Luminiszenzausbeute aus 2 Kontrollmessungen

2 = Gemittelte Luminiszenzausbeute aus 4 Einzelmessungen der
Konzentration 10^{-2} g/100 ml des Dodonaea-
Saponingemisches

(290e3 = 290×10^3 counts per minute)

3. Molluskizid-Test

Die bisher in Pflanzen aufgefundenen Molluskizide gehören verschiedenen Stoffgruppen an. Beschrieben wurden Saponine, Flavonoide, Terpenoide, Tannine und weitere in Tabelle 9 angeführte Stoffklassen.

Die bedeutendste Gruppe stellen jedoch die Saponine dar. HOSTETTMANN (124) wies nach, daß nur monodesmosidische Saponine wirksam sind, während Bisdesmoside erst nach Abspaltung eines Zuckerteiles Wirkung zeigen.

Wir testeten die molluskizide Wirkung der Dodonaea- und Schefflera-Saponingemische an Biomphalaria glabrata Schnecken.

Bei dieser Schneckenart handelt es sich um einen Zwischenwirt bei der Verbreitung der Bilharziose. Diese stellt eine parasitäre Erkrankung dar, von der mehr als 200 Millionen Menschen in 70 afrikanischen, lateinamerikanischen und asiatischen Ländern betroffen sind.

Die Bekämpfung der Bilharziose kann über eine Chemotherapie oder über die Vernichtung des Zwischenwirtes erfolgen. Zur Vernichtung des Zwischenwirtes können synthetische und natürliche Molluskizide eingesetzt werden, wobei bei natürlichen Molluskiziden Kosten und Transportprobleme entfallen.

Das Dodonaea-Saponingemisch zeigte im Molluskizid-Test eine bemerkenswerte Aktivität. Bei einer Konzentration von 25 ppm waren alle Biomphalaria glabrata Schnecken innerhalb von 24 h tot, bei einer Verdünnung auf 12,5 ppm nach 40 h.

Das Saponingemisch aus Schefflera venulosa wies eine geringere Aktivität auf. Bei einer Konzentration von 60 ppm waren 100 % der Schnecken nach 24 h tot, bei weiteren Verdünnungen konnte keine Aktivität mehr festgestellt werden.

Tab. 9: Pflanzeninhaltsstoffe mit molluskizider Aktivität

Stoffklasse	Pflanze	Literatur
Saponine	<i>Hedera helix</i> L.	(33)
	<i>Phytolacca dodecandra</i> l'HERIT	(125)
	<i>Cornus florida</i> L.	(32)
	<i>Lonicera nigra</i> L.	(35)
	<i>Balanites aegyptiaca</i> DEL.	(126)
	<i>Wedelia scaberrima</i> BENT.	(127)
	Asparagus-Arten	(128)
	<i>Solanum mammosum</i> L.	(129)
Flavonoide	<i>Polygonum nodosum</i> PERS.	(130)
	<i>Polygonum senegalense</i> MEISN.	(131)
	<i>Baccharis genistelloides</i> PERS. var. <i>trimeria</i> BACKER	(132)
Chalcone	<i>Polygonum senegalense</i> MEISN.	(133)
Iridoidglykoside	<i>Olea europaea</i> L.	(134)
Diterpene	<i>Wedelia scaberrima</i> BENT.	(135)
	<i>Baccharis genistelloides</i> PERS. var. <i>trimeria</i> BACKER	(132)
Sesquiterpene	<i>Warburgia ugandensis</i>	(136)
	<i>Warburgia stuhlmannii</i>	(137)
	<i>Podachaenium eminens</i> (LAG). BAILL.	(138)
Sesquiterpen- lactone	<i>Ambrosia maritima</i> L.	(139)
Alkenylphenole	<i>Anacardium occidentale</i> L.	(140)
Tannine	<i>Acacia nilotica</i> WILLD. EX DEL.	(141)
	<i>Krameria triandra</i> RUIZ et PAV.	(142)
	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) SPRENGEL	(142)
	<i>Diospyros usambarensis</i> A.DC.	(143)
Furanocumarine	<i>Ruta chalepensis</i> L.	(144)
Isobutylamide	<i>Heliopsis longipes</i> (A. GRAY) BLAKE	(145)
	<i>Fagara macrophylla</i> ENGL.	(146)

D. Z U S A M M E N F A S S U N G

I. Strukturaufklärung des Hauptsaponins und pharmakologische Untersuchung des Saponingemisches aus Dodonaea viscosa

Aus den Samen von *Dodonaea viscosa* wurde in 2.75 %iger Ausbeute ein von Fremdbestandteilen gereinigtes Estersaponin-gemisch isoliert.

Durch DCC-Chromatographie und Präparative DC konnte daraus ein Hauptsaponin in chromatographisch reiner Form dargestellt werden.

Nach alkalischer und saurer Hydrolyse wurde durch MS, Periodat-Oxidation, IR- und ^{13}C -NMR-Spektroskopie als genuines Aglykon R₁-Barrigenol (3 β , 15 α , 16 α , 21 β , 22 α , 28-Hexahydroxy-12-oleanen) identifiziert.

Als Zuckerbestandteile konnten nach Mikrohydrolyse, Darstellung der Alditolacetate und FAB-MS-Untersuchung des entacylierten Saponins Arabinose, Galaktose und Glucuronsäure im Molverhältnis 1:1:1 nachgewiesen werden.

Die Verknüpfung der Monosaccharide wurde durch GC/MS-Untersuchung der partiell methylierten Alditolacetate ermittelt. Die in pyranoider Form vorliegende Glucuronsäure erwies sich als geninständig und in 2- und 3-Stellung durch endständige Arabinofuranose und Galaktopyranose substituiert. Durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie konnte für Glucuronsäure und Galaktose β -Konfiguration und für Arabinose α -Konfiguration nachgewiesen werden.

Als Verknüpfungsstelle des Kohlenhydratteiles mit dem Aglykon wurde die Position 3 ermittelt.

Damit hat das Desacyl-Saponin die Struktur eines R₁-Barrigenol-3-O- β -D-glucuronopyranosids, das in 2- und 3-Position der Glucuronsäure durch α -L-Arabinofuranose und β -D-Galaktopyranose substituiert ist.

Für den Säureanteil des Dodonaea-Saponins wurden durch Gaschromatographie Methylbuttersäure und Angelicasäure und durch FAB-MS eine dritte, gaschromatographisch nicht erfaßbare Säure vom Molekulargewicht 116 ("Säure 3") identifiziert.

Bei der Darstellung der Esteraglykone durch enzymatische Hydrolyse ergab das Dodonaea-Hauptsaponin ein Gemisch aus zwei Komponenten (Esteraglykon 1 und 2).

Esteraglykon 1 ist nach den Ergebnissen einer gaschromatographischen und massenspektrometrischen Analyse mit Methylbuttersäure und "Säure 3" verestert, während an Esteraglykon 2 Angelicasäure und "Säure 3" gebunden sind.

Durch ^1H -NMR-Untersuchung der Acetonide von Esteraglykon 1 und 2 konnten als Verknüpfungsorte für die Säuren die Positionen 21 und 22 ermittelt werden.

Außerdem wurde nachgewiesen, daß es sich bei der in Esteraglykon 1 vorliegenden Methylbuttersäure um 2-Methylbuttersäure handeln muß.

Für "Säure 3" wird aufgrund der MS- und ^1H -NMR-Spektren die Struktur einer bisher in Estersaponinen noch nicht beschriebenen 2,3-Dimethyl-oxiran-2-carbonsäure vorgeschlagen.

Das Dodonaea-Hauptsaponin stellt ein Gemisch aus zwei im Kohlenhydratteil und Aglykon identischen Komponenten dar, die jeweils in 21- und 22-Position des Aglykons mit zwei organischen Säuren verestert sind. Bei einer Säurekomponente handelt es sich in beiden Fällen um die für "Säure 3" vorgeschlagene 2,3-Dimethyl-oxiran-2-carbonsäure, bei der zweiten um 2-Methylbuttersäure (Esteraglykon 1) bzw. um Angelicasäure (Esteraglykon 2).

Da Dodonaea viscosa in der Volksmedizin Verwendung bei der Behandlung von Rheuma und Gicht findet, wurde das Saponin-gemisch auf antiödematöse bzw. immunologische Aktivität geprüft.

Im Viscarin-Carrageenin-Ödem-Test an Rattenpfoten zeigte das Saponingemisch dosisabhängig eine Ödemhemmung bis zu etwa 55 %. Die antiexsudative Wirkung war mit der des therapeutisch verwendeten Aescins vergleichbar, allerdings erwies sich die Gewebeverträglichkeit als geringer.

Im Granulocyten-Test wurde die größte Steigerung der Phagocytose um etwa 25 % bei einer Konzentration von 10^{-2} mg/ml gemessen. Im Chemoluminiszenz-Test bewirkte das Saponingemisch eine Verstärkung der Chemoluminiszenz bis zu ca. 67 %, die sich jedoch als phagocytoseunabhängig erwies.

Bei der Prüfung auf molluskizide Aktivität zeigte das *Dodonaea*-Saponingemisch in einer Konzentration von 25 ppm hohe Wirksamkeit.

II. Charakterisierung der Saponine aus *Schefflera venulosa*

Aus einem Alkoholextrakt von *Schefflera venulosa* wurde in 7.3 %iger Ausbeute ein Saponingemisch isoliert.

Durch Mikrohydrolyse und Darstellung der Alditolacetate konnten die Monosaccharide Arabinose, Xylose, Rhamnose, sowie Glucose und Glucuronsäure identifiziert werden.

Bei den nach saurer bzw. enzymatischer Hydrolyse erhaltenen Aglykonen handelt es sich um Oleanolsäure und um ein nicht identifiziertes Isomeres von Oleanolsäure.

E. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Herkunft der Drogen und Testsubstanzen

Drogen

Die Samen von *Dodonaea viscosa* wurden uns im Herbst 1982 von den Hamdard Laboratories in New-Delhi zur Verfügung gestellt.

Der ethanolische Extrakt (Gesamtpflanze) aus *Schefflera venulosa* wurde im Frühjahr 1983 ebenfalls von den Hamdard Laboratories in New-Delhi hergestellt.

Testsubstanzen

Oleanolsäure, Ursolsäure und Hederagenin stammen aus der Testsubstanzensammlung des Institutes.

R₁-Barrigenol stellte uns Professor Hiller, Humboldt-Universität Berlin Sektion Chemie, zur Verfügung.

Aescin und Protoaescigenin erhielten wir von der Fa. Madaus, Köln.

Echinocystsäure wurde von Professor Kozuka, Kyoto College of Pharmacy, zur Verfügung gestellt.

Enzyme

Cellulase von *Aspergillus niger* 1.3U/mg

Fa. Sigma (Nr. C-7377)

Cellulase von *Aspergillus niger* 0.3U/mg

Fa. Serva

β -Glucuronidase von *Helix pomatia* Type H-1
Fa. Sigma (Nr. G-0751)

Reduktionsreagenzien

NaBH_4 Fa. Merck, Art. 806373

NaBD_4 Fa. Merck, Art. 3435

II. Chromatographische Arbeitsmethoden

1. Dünnschichtchromatographie

1.1. Adsorbentien

Kieselgel 60 F_{254} -Fertigplatten 20 x 20 cm,
Schichtdicke 0.25 mm, Fa. Merck

Kieselgel 60 F_{254} -Fertigplatten für die Nano-DC (HPTLC)
10 x 10 cm, Fa. Merck

Cellulose F-Fertigplatten 20 x 20 cm,
Schichtdicke 0.1 mm, Fa. Merck

Reversed Phase-Fertigplatten RP-8 F_{254s} 5 x 10 cm,
Schichtdicke 0.25 mm, Fa. Merck

1.2. Fließmittelsysteme

Saponine und Zucker

Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10)

Chloroform-Methanol-Wasser (70:50:10)

Chloroform-Methanol-Eisessig-Wasser (60:12:32:8)

Chloroform-n-Propanol-Methanol-Wasser (9:2:12:8)
(Unterphase)

Estersapogenine und Sapogenine

Toluol-Aceton (8:2)

Toluol-Aceton (6:4)

Dichlormethan-Ethylacetat (65:35)

Dichlormethan-Ethylacetat-Methanol (10:3:4)

Organische Säuren

n-Butanol gesättigt mit Ammoniak 25 %

1.3. Detektion

Saponine und Sapogenine

Komarowskys Reagens:

Lösung I: 4-Hydroxybenzaldehyd 2 % in Methanol

Lösung II: Schwefelsäure 50 %

Sprühlösung: Kurz vor Gebrauch werden 50 ml Lösung I mit
5 ml Lösung II gemischt.

Nachbehandlung: 5 - 10 min auf 100 °C erhitzen.

Die Saponine erscheinen als graue, blaue oder violette Zonen.

Vanillin-Schwefelsäure-Reagens:

Lösung I: Vanillin 1 % in Ethanol

Lösung II: Schwefelsäure 10 % in Ethanol

Die DC-Platte wird nacheinander mit Lösung I und Lösung II besprüht und darauf 10 min bei 110 °C getrocknet.

Antimon-III-chlorid-Reagens:

Gesättigte Lösung von Antimon-III-chlorid in Chloroform

Nachbehandlung: 10 min auf 100 °C erhitzen

Betrachten des Chromatogramms im langwelligen UV

Blutkörperchensuspension:

2 ml Citratblut (100 ml einer 3.65 %igen Natriumcitratlösung werden mit 900 ml frischem Rinderblut versetzt) und 30 ml Phosphatpufferlösung (pH 7.4) werden gemischt und waagerecht auf die Platte gesprüht. Die Saponine erscheinen als weiße Zonen auf der blutbenetzten DC-Platte.

Natriummetaperiodat-Benzidin-Reagens:

Lösung I: Natriummetaperiodat (0.1 % in Wasser)

Lösung II: 1.8 g Benzidin werden in 50 ml Ethanol gelöst und mit 50 ml Wasser, 20 ml Aceton und 10 ml 0.2N HCl versetzt.

Nach Besprühen mit Lösung I wird 5 min gewartet, darauf mit Lösung II besprüht. Es erscheinen weiße Zonen auf blauem Untergrund.

Zucker

Diphenylaminophosphorsäure-Reagens:

2 g Diphenylamin, 2 g Anilin und 10 ml Phosphorsäure 85 % werden gemischt und mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt.

Nachbehandlung: 10 min auf 100 °C erhitzen.

Organische Säuren

Methylrot-Indikator pH 9:

Methylrot 0.2 % in Methanol, mit 0.5N NaOH auf pH 9 eingestellt.

2. Präparative Schichtchromatographie

Adsorbens

Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten 20 x 20 cm,
Schichtdicke 0.5 mm, Fa. Merck

Vorbehandlung: Zweimalige Entwicklung in Methanol 80 %

Auftragemenge: 4 mg pro Platte

Fließmittelsysteme:

Dodonaea-Saponin: Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10)

Dodonaea-Aglykon: Dichlormethan-Ethylacetat (65:35)
(methyliert)

Schefflera Aglykone: Toluol-Aceton (8:2)

Detektion:

Besprühen des Randteiles der Platte mit Komarowskys Reagens
bzw. Besprühen mit Wasser

Elution:

Dodonaea-Saponin: Methanol

Dodonaea-Aglykon (methyliert) und Schefflera Aglykone:
Dichlormethan, Dichlormethan-Ethylacetat (1:1), Dichlor-
methan-Methanol (1:1)

Aufarbeitung:

Zentrifugation, Filtration durch eine Glasfritte (G4) und
durch ein Porenfilter (0.45 µ).

3. Säulenchromatographie

Adsorbens: Kieselgel 60, Korngröße 0.063-0.200 mm, Fa. Merck

Eluens:

Dodonaea-Aglykon: Dichlormethan-Ethylacetat-Methanol (10:3:4)

Dodonaea-Esteraglykon: Dichlormethan-Ethylacetat (65:35)

Auftragemenge: 300-400 mg pro 100 g Kieselgel

Durchführung:

100 g Kieselgel wurden mit dem Elutionsmittel zu einem Brei aufgeschlämmt und zur Entfernung von Luftblasen 30 min gerührt. Nach Eingießen der Masse in eine Glassäule wurde einige Stunden mit dem Elutionsmittel gewaschen und mit einem Rundfilter und Seesand bedeckt. Das zu trennende Substanzgemisch wurde mit Kieselgel verrieben und nach Aufgeben auf die Säule mit Seesand überschichtet. Zur Erhöhung der Trennleistung wurde eine weitere Säule mit Eluens aufgesetzt. Das Eluat wurde mit einem Fraktionsschneider in 5 ml Mengen gesammelt und dünnschichtchromatographisch überprüft.

4. Droplet-Counter-Current-Chromatographie (DCCC)

Gerät:	DCC-A (Tokyo Rikakikai, Japan)
Säulen:	300 Glassäulen, 400 x 2 mm
Druck:	7-10 kp/cm ²
Durchflußrate:	15-20 ml/h
Temperatur:	12 °C
Probeneingabe:	200 mg Saponingemisch werden in einer Mischung von stationärer und mobiler Phase (1:1) gelöst.
Trennsystem:	Chloroform-n-Propanol-Methanol-Wasser (9:2:12:8)
Methode:	aufsteigend
Detektion:	Chromatographie der Fraktionen auf HPTLC-Platten, Detektion mit Komarowskys Reagens.
Aufarbeitung:	Die vereinigten Fraktionen werden im Vakuum von den organischen Lösungsmitteln befreit und gefriergetrocknet.

5. Gaschromatographie

Gerät: Perkin Elmer 900
Trägergas: Argon
Gasdurchfluß: 30 ml/min
Detektor: FID
Schreiber: Perkin Elmer 56
Papiervorschub: 5 mm/min

Säuren:

Säule: Glas, 180 cm x 4 mm
Säulenfüllung: 25 % Diethylhexylsebacinat/Sebacinsäure
auf Chromosorb W-NAW (80-100 mesh)
Einlaßtemperatur: 250 °C
Detektortemperatur: 250 °C
Säulentemperatur: 145 °C isotherm

Dodonaea-Alditolacetate:

Säule: Glas, 6 ft x 2 mm
Säulenfüllung: GP 3 % SP-2330 auf 100/120 Supelcoport
Einlaßtemperatur: 250 °C
Detektortemperatur: 250 °C
Säulentemperatur: 225 °C

Schefflera-Alditolacetate:

Säule: Glas, 300 cm x 2 mm
Säulenfüllung: 3 % OV-225 auf Chromosorb W-HP
(80-100 mesh)
Einlaßtemperatur: 250 °C
Detektortemperatur: 250 °C
Säulentemperatur: 215 °C

Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Gaschromatographie:

Gerät: Carlo Erba (Milano) Fractovap 2110 für split- und
splitlose Injektion

Säule: Quarzkapillare 30 m x 0.25 mm Ø mit OV 1701 beschichtet

Trärgas: 1.8 ml/min Helium

Temperaturprogramm: 100 °C bis ca. 260 °C mit 3 °C/min

Massenspektrometrie:

Gerät: Varian CH 7A gekoppelt mit dem Datensystem
Varian 188-MS

Energiequelle: 70 eV

Die GC/MS-Kopplung erfolgte als offene Kopplung mit einer
Glaskapillare

III. Isolierungen

1. Gewinnung des Dodonaea-Saponingemisches

1.1. Extraktion mit Methanol

400 g grob gepulvertes Dodonaea-Samenmaterial wurde mit 3 l
Petrolether 3 Tage am Soxhlet entfettet. Die Droge wurde
darauf 2 Tage mit 3 l Methanol 90 % extrahiert. Der Methanol-
extrakt wurde am Rotavapor zur Trockene eingeengt. Durch Zu-
gabe von einigen Siedesteinchen und etwas Butanol konnte ein
zu starkes Schäumen des Extraktes verhindert werden.

Der zähe, braune Rückstand (52 g) wurde in 1.5 l Wasser ge-
löst und zur Entfernung lipophiler Begleitstoffe 3mal mit je
1 l Chloroform ausgeschüttelt. Die dabei entstehenden Emul-
sionen konnten durch Zentrifugieren fast vollständig ge-
trennt werden.

Die Saponine wurden der wäßrigen Lösung durch 3maliges Ausschütteln mit je 1 l wassergesättigtem Butanol entzogen. Nach Einengen der vereinigten Butanolphasen verblieben 20 g gelbbrauner Rückstand.

Dieser wurde in wenig Methanol gelöst und unter Rühren in 4 l Ether eingetropft. Der weißgelbe, flockige Niederschlag ergab nach erneuter Fällung 15.6 g Rohsaponingemisch.

Da das Rohsaponingemisch noch leicht gelb gefärbt war und chromatographisch nachweisbare nichtsaponinische Bestandteile enthielt, wurde es 2mal mit je 7 g Aktivkohle behandelt. Nach wiederholter Etherfällung verblieben 11 g (2.75 % der Drogeneinwaage) eines weißen Saponingemisches, das keine chromatographisch nachweisbaren, fremden Bestandteile mehr enthielt.

1.2. Extraktion mit Wasser

100 g gemahlene Dodonaea-Samenmaterial wurde 3 Tage mit 1.5 l Petrolether am Soxhlet entfettet.

Nach Abdunsten des Lösungsmittels erfolgte eine unter Rühren durchgeführte 1-stündige Mazeration des Drogenmaterials mit 1 l Wasser.

Nach Filtrieren und Zentrifugieren des Mazerates wurde zur Gewinnung der Saponine 3mal mit je 500 ml wassergesättigtem Butanol ausgeschüttelt. Die vereinigten, zur Trockene eingengten Butanolphasen ergaben einen gelbbraunen Rückstand von 2.7 g.

Dieser wurde in wenig Methanol aufgenommen und unter Rühren in 1 l Ether getropft.

Der Niederschlag wurde mit Aktivkohle (Verhältnis Substanz-Aktivkohle 2:1) behandelt und nochmals gefällt.

Die zweite Fällung ergab 1.35 g eines weißen Saponingemisches.

2. Isolierung des Dodonaea-Hauptsaponins

Zur Gewinnung eines chromatographisch reinen Hauptsaponins wurde das gereinigte Saponingemisch durch DCCC-Trennung (siehe II.4.) fraktioniert.

Es konnten pro Trennung aus 200 mg Saponingemisch 15 mg einer Fraktion D erhalten werden, die das Hauptsaponin verunreinigt mit einem Nebensaponin enthielt (Abb. 6).

Aus Fraktion D wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie das Hauptsaponin dargestellt (siehe II.2.).

3. Isolierung des Dodonaea-Aglykons

Zur Darstellung des Aglykongemisches wurde das gereinigte Saponingemisch (800 mg) zunächst einer alkalischen Hydrolyse nach IV.1.1. unterzogen.

Das entacylierte Produkt (500 mg) wurde anschließend durch salzsaure Hydrolyse nach IV.1.2. zu einem Aglykongemisch abgebaut.

Die Reindarstellung des Aglykons erfolgte durch Säulenchromatographie (siehe II.3.). Aus 250 mg Aglykongemisch wurden 50 mg reines und 100 mg gering verunreinigtes Aglykon erhalten. Durch nachfolgende Kristallisation aus Chloroform-Methanol-Gemischen konnte ein Teil der Verunreinigungen abgetrennt werden. Es verblieben insgesamt 100 mg chromatographisch reines Aglykon.

4. Isolierung der Dodonaea-Esteraglykone

Die Abspaltung des Kohlenhydrateiles aus dem Saponingemisch erfolgte durch enzymatische Hydrolyse mit Cellulase nach IV.1.5. Das zum Teil noch unvollständig hydrolysierte Esteraglykongemisch wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel (siehe II.3.) aufgetrennt. Ausgehend von 400 mg

(2 Trennungen mit je 200 mg) konnten 55 mg E1, 33 mg Gemisch aus E1 und E2 und 20 mg E2 erhalten werden.

5. Isolierung des Schefflera-Saponingemisches

30 g ethanolischer Schefflera-Extrakt wurden in 1 l Wasser suspendiert und zur Entfernung des Chlorophylls 5mal mit je 1 l Petrolether und 3mal mit je 1 l Dichlormethan ausgeschüttelt.

Durch 3malige Verteilung gegen je 1 l wassergesättigtes Butanol wurden die Saponine der Wasserphase entzogen.

Die vereinigten Butanolphasen wurden zur Trockene eingengt, in wenig Methanol gelöst und unter Rühren in 2 l Ether eingetropft. Nach wiederholter Fällung wurde der Niederschlag (5 g) zweimal mit Aktivkohle behandelt (Substanz-Aktivkohle 1:1). Nach erneuter Fällung verblieben 2.2 g weißgelbes Saponingemisch.

IV. Chemische und physikalische Arbeitsmethoden

1. Hydrolysen

1.1. Alkalische Hydrolysen

Dodonaea-Saponingemisch

Zur Gewinnung eines entacylierten Saponingemisches wurden 800 mg des gereinigten Saponingemisches mit 100 ml 0.5N wäßriger Natronlauge versetzt und 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 50 %iger Schwefelsäure neutralisiert, das Verseifungsprodukt 3mal mit je 100 ml wassergesättigtem Butanol ausgeschüttelt und zur Trockene eingengt.

Zur Extraktion der organischen Säuren wurden 50 mg Saponin-

gemisch mit 10 ml 0.5N NaOH 5 h gerührt.

Das Hydrolysat wurde anschließend mit 50 %iger H_2SO_4 auf pH 1 angesäuert. Die Säuren wurden durch fünfmalige Ausschüttelung mit je 5 ml Ether p.A. abgetrennt und die vereinigten, im N_2 -Strom auf ein kleines Volumen eingedampften Etherphasen zur GC verwendet.

Dodonaea-Hauptsaponin

10 mg Dodonaea-Hauptsaponin wurden in 2 ml 0.5N NaOH gelöst und 5 h bei Raumtemperatur belassen. Nach Neutralisation der Lösung mit 0.5N HCl wurde das entacylierte Produkt 3mal mit je 2 ml wassergesättigtem Butanol ausgeschüttelt und zur Trockene eingedampft.

Dodonaea-Esteraglykon

Zur Abtrennung der organischen Säuren wurden 5 mg Esteraglykon mit 2 ml 0.5N methanolischer KOH 30 min unter Rückfluß erhitzt. Nach Versetzen mit 2 ml Wasser und Abrotieren des Methanols wurde die Lösung mit 1N HCl auf pH 1 gebracht. Das im Wäßrigen unlösliche Aglykon wurde abfiltriert. Aus der sauren Lösung konnten die organischen Säuren mit Ether p.A. ausgeschüttelt werden. Die vereinigten Etherphasen wurden getrocknet und nach Einengen zur Gaschromatographie verwendet.

Schefflera-Saponingemisch

10 mg Saponingemisch wurden mit 2 ml 0.5N wäßriger NaOH 30 min unter Rückfluß erhitzt. Nach Neutralisation der alkalischen Lösung mit 1N HCl wurden die Saponine 3mal mit je 2 ml wassergesättigtem Butanol ausgeschüttelt und chromatographiert.

1.2. Saure Hydrolysen

Hydrolyse mit Salzsäure

Zur Gewinnung des Dodonaea-Aglykongemisches wurden 500 mg entacyliertes Saponingemisch (siehe 1.1.) mit 50 ml einer Lösung von 10 g konzentrierter HCl (37 %) in 100 ml Methanol versetzt und 2 h unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlen der Lösung wurden 50 ml Wasser zugegeben. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Zur Darstellung des Schefflera-Aglykongemisches gingen wir von 50 mg gereinigtem Saponingemisch aus. Nach zweistündiger Hydrolyse mit 10 ml 10 %iger methanolischer HCl wurde die Probe wie oben beschrieben aufgearbeitet.

Hydrolyse mit Trifluoressigsäure

Sie diente als Hydrolysemethode für den dünnschichtchromatographischen Nachweis der Monosaccharide.

5 mg Saponin wurden in 2 ml 2N TFA gelöst und 2-5 h am Dampfbad erhitzt. Zur Entfernung der Säure wurde das Hydrolysat mehrmals nach Zugabe von etwas Methanol zur Trockene eingeengt.

1.3. Partialhydrolyse

Je 1 mg entacyliertes Dodonaea-Saponin wurde mit 1 ml HCl (0.1N) bzw. TFA (0.1N, 0.5N, 1N) bzw. Ameisensäure (50 %, 70 %) versetzt und bei 60 °C und bei Siedetemperatur hydrolysiert.

In bestimmten Zeitabständen wurden Proben entnommen und dünnschichtchromatographisch überprüft.

1.4. Mikrohydrolyse auf HPTLC-Platten (51)

Das Saponin wurde mit den entsprechenden Vergleichszuckern auf eine HPTLC-Platte aufgetragen. Diese wurde in eine Glaskammer gebracht, die ein mit rauchender HCl gefülltes Vorratsgefäß enthielt.

Die Bedampfung erfolgte 30 min im Trockenschrank bei 90 °C. Zur Entfernung der Salzsäure wurde die Platte 2 h abgekönt und darauf im System Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10) entwickelt.

Die Detektion erfolgte mit Diphenylaminophosphorsäure-Reagens.

Zweidimensionale Mikrohydrolyse

Hierzu wurde die Platte zunächst im obengenannten Fließmittelsystem entwickelt. Nach Trocknen der Platte wurde die HCl-Bedampfung wie beschrieben durchgeführt. Anschließend erfolgte die zweite Entwicklung quer zur ersten Laufrichtung.

1.5. Enzymatische Hydrolysen

Hydrolyse mit Cellulase

Zur Gewinnung eines zuckerfreien Dodonaea-Esteraglykongemisches wurden 1 g (100 mg) Saponingemisch mit der gleichen Menge Cellulase 1.3U/mg bzw. der dreifachen Menge Cellulase 0.3U/mg versetzt und in 500 (50) ml Acetatpuffer (50 mmol, pH 5.2) gelöst. Das Gemisch wurde 3 Tage bei 39 °C inkubiert. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Esteraglykone konnten auch durch 3maliges Ausschütteln der inkubierten Suspension mit je 250 (50) ml Dichlormethan gewonnen werden.

(Analog erfolgte die Cellulase-Hydrolyse des Hauptsaponins). Die Auftrennung des Estersaponingemisches erfolgte durch Säulenchromatographie (siehe II.3.).

Hydrolyse mit Schneckenenzym

Das Schneckenenzym wurde aus dem Darm von Weinbergschnecken wie bei HUBER (91) beschrieben, gewonnen. 20 mg Dodonaea-Saponingemisch wurden in 10 ml Acetatpuffer (50 mmol, pH 5.2) gelöst, mit 2 ml Darminhalt versetzt und 3 Tage bei 39 °C thermostatisiert.

Zur Extraktion der Esteraglykone wurde 3mal mit je 10 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und zur Trockene eingengt.

Hydrolyse mit β -Glucuronidase

Zur Abspaltung der Zucker des Schefflera-Saponingemisches wurden 10 mg Substanz und die gleiche Menge β -Glucuronidase in 5 ml Acetatpuffer (50 mmol, pH 5.2) gelöst und 3 Tage bei 39 °C inkubiert. Die trübe Lösung wurde 3mal mit je 2 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Nach Vereinigen und Einengen der Dichlormethanphasen wurden diese dünnschichtchromatographisch untersucht.

Analog erfolgte die Hydrolyse des entacylierten Dodonaea-Saponins.

2. Derivate

2.1. Darstellung der Alditolacetate (61)

2 mg Saponin wurden mit 2 ml 2N TFA versetzt und 5 h unter Rückfluß am Wasserbad erhitzt. Darauf wurde die Probe unter wiederholter Zugabe von Wasser am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt, bis die wäßrige Lösung neutral reagierte. Sie wurde mit einer Spatelspitze NaBH_4 (bis zur alkalischen Reaktion) versetzt und 3 h bei Raumtemperatur belassen. Zur Zerstörung des überschüssigen NaBH_4 wurden 2 ml Essigsäure p.A. zugegeben und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mehrmals in je 3 ml Methanol p.A. und 2 ml Essigsäure p.A. aufgenommen und abermals zur Trockene einro-

tiert. Nach Zugabe von 1 ml Essigsäureanhydrid wurde die Probe 2 h im Wasserbad unter Rückfluß acetyliert. Überschüssiges Essigsäureanhydrid wurde durch mehrmalige Destillation mit Toluol p.A. entfernt. Der Rückstand wurde in 3 ml Chloroform p.A. aufgenommen und 3mal mit Wasser ausgeschüttelt. Die zur Trockene eingeeengte Chloroformphase wurde in 20 µl Chloroform gelöst und zur Gaschromatographie verwendet.

2.2. Methylierung nach HAKOMORI (68)

10 mg entacyliertes Saponin wurden in einem Injektionsfläschchen in 5 ml getrocknetem DMSO (Molekularsieb 4 Å) gelöst und nach Stickstoffbegasung versiegelt. Anschließend wurden über eine Injektionsnadel langsam 2.5 ml Natrium-methyl-sulfinyl-methanid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min ultrabeschallt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nun wurden unter Eiskühlung über eine Injektionsnadel 2.5 ml Methyliodid zugetropft, wobei zum Druckausgleich eine zweite Nadel benötigt wird. Nach 3-stündiger Ultrabeschallung wurde die Probe in einen Spitzkolben überführt und im Vakuum von überschüssigem Methyliodid befreit. Die Lösung wurde anschließend mit 7 ml Wasser versetzt und 3mal mit je 3 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Zur Entfernung des DMSO wurden die vereinigten Dichlormethanphasen 10mal mit Wasser gewaschen und darauf zur Trockene eingeeengt.

2.3. Darstellung der partiell methylierten Alditolacetate (63)

Die nach 2.2. vorbehandelte Probe wurde mit 5 ml 2N TFA versetzt und 5 h unter Rückfluß am Wasserbad hydrolysiert. Zur Darstellung der Alditolacetate wurde die Probe wie bei 2.1. beschrieben aufgearbeitet. Anstelle von NaBH_4 wurde zur Reduktion NaBD_4 (Fa. Merck) verwendet.

2.4. Acetylierung

6 mg Esteraglykon wurden in 1 ml Essigsäureanhydrid/Pyridin 1:1 gelöst und 3 Tage bei Raumtemperatur belassen. Die Lösung wurde darauf in 20 ml Eiswasser getropft. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen, bis kein Geruch nach Pyridin mehr wahrnehmbar war, und getrocknet.

2.5. Darstellung der Acetonide (92)

5-10 mg (Ester)aglykon wurden in 5-10 ml Aceton, das 0.5 % Dimethoxypropan enthielt, gelöst.

Nach Zugabe von 0.5-1 ml 1 %iger acetonischer p-Toluolsulfonsäurelösung wurde das Reaktionsgemisch mit Stickstoff begast und gut verschlossen über Nacht aufbewahrt. Die Probe wurde anschließend mit 5-10 Tropfen wasserfreiem Pyridin versetzt und im Vakuum bis fast zur Trockene eingeengt. Die konzentrierte Lösung wurde in Eiswasser eingetropft, mehrmals mit Wasser und Natriumcarbonatlösung gewaschen und getrocknet.

Eine dünnschichtchromatographische Untersuchung der Ausgangs- und Endprodukte zeigte, daß die Reaktion quantitativ verlaufen war.

3. Physikalisch-chemische Untersuchungen

Schmelzpunkte

Gerät: Kofler Heizplatte der Fa. Reichert, Wien
die Werte sind unkorrigiert

Optische Drehung

Gerät: Polarimeter LEP A 2 der Fa. Zeiss
Lösungsmittel: Methanol

IR-Spektren

Gerät: IR-Spektrophotometer Acculab 1 der Fa. Beckman

Probe: als KBr-Preßling

Massenspektren

EI-MS

Gerät: Massenspektrometer MS 30 der Fa. AEI, Manchester und
MS 902, Fa. AEI, Manchester (am Institut für Organische Chemie der Universität München)

FAB-MS

Gerät: Massenspektrometer MS 50 der Fa. Kratos

Matrix: Glycerin

Die Spektren wurden bei der Fa. GBF in Braunschweig aufgenommen.

¹H-NMR-Spektren

Gerät: Kernresonanzspektrometer WM 400 der Fa. Bruker

Medium: CDCl₃

Standard: TMS

Die Spektren wurden bei der Fa. GBF, Braunschweig aufgenommen.

¹³C-NMR-Spektren

Gerät: Kernresonanzspektrometer WP 200 der Fa. Bruker

Medium: Deuteropyridin

Die Spektren wurden bei 50.3 MHz im Institut für Anorganische Chemie der Universität München aufgenommen.

4. Hämolytischer Index

Der Hämolytische Index wurde in Abänderung der Arzneibuchmethode nach einer Institutsvorschrift von WAGNER und BLADT (24) bestimmt.

Aus 0.2 g Droge wurde ein ethanolischer Extrakt bereitet.

Die 0.1 g entsprechende Menge wurde zur Trockene eingedampft und in 100 ml Phosphatpuffer pH 7.4 gelöst. Die gegen ein Standardsaponin durchgeführte Bestimmung erfolgte im Reagensglas durch Herstellung von Verdünnungsreihen.

H.I. der Droge: 1000

H.I. des gereinigten Saponingemisches: 30.000.

V. Meßdaten

1. ^{13}C -NMR-Daten des Dodonaea-Aglykons

($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 50.3 MHz)

(ppm): 15.95, 16.57, 17.66, 19.15, 19.35, 21.02,
24.06, 28.24, 28.73, 30.54, 36.35, 36.83,
37.50, 39.38, 39.47, 41.55, 42.12, 47.46,
47.48, 47.88, 48.19, 55.71,
(C-OH) 67.46, 67.97, 72.43, 77.41, 78.14, 78.47,
(C=C) 124.59, 144.83

2. ^1H -NMR-Daten der Acetonide

Diacetonid des Dodonaea-Aglykons (R_1 -Barrigenol)

(CDCl_3 , Standard: TMS)

H und Methyl:

ppm	Zuordnung	ppm	Zuordnung
0.98	23-Methyl	3.21 (m)	3 β -H
0.78	24-Methyl	4.39 (d, J= 6.8 Hz)	15 α -H
0.91	25-Methyl	4.93 (d, J= 6.8 Hz)	16 α -H
0.87	26-Methyl	3.70 (d, J=10.1 Hz)	21 β -H
1.55	27-Methyl	4.11 (d, J=10.1 Hz)	
0.99	29-Methyl	3.40 (d, J=11.8 Hz)	28-H
1.03	30-Methyl	3.49 (d, J=11.8 Hz)	28-H
		5.32 (m)	12-H

Acetonid-Methyl: 1.21 ppm

1.41 ppm

1.46 ppm

1.48 ppm

Acetonid des Dodonaea-Esteraglykon 1
(CDCl₃, Standard: TMS, D₂O-Austausch)

H und Methyl:

ppm	Zuordnung	ppm	Zuordnung
0.91	23-Methyl	3.21 (m)	3β-H
0.78	24-Methyl	4.18 (d, J= 6.8 Hz)	15α-H
0.90	25-Methyl	3.86 (d, J= 6.8 Hz)	16α-H
0.87	26-Methyl	5.32 (d, J=10.1 Hz)	21β-H
1.61	27-Methyl	5.79 (d, J=10.1 Hz)	
0.98	29-Methyl	2.90 (d, J=11.8 Hz)	28-H
1.05	30-Methyl	3.28 (d, J=11.8 Hz)	28-H
		5.48 (m)	12-H

2-Methylbuttersäure: α-Methyl 1.17 ppm (d, J= 7 Hz)
β-Methyl 0.93 ppm (t, J= 7 Hz)

"Säure 3":
H 3.05 ppm (q, J=5.3 Hz)
Methyl 1.35 ppm (d, J=5.3 Hz)
Methyl ~ 1.3 ppm (s)

Acetonid-Methyl: 1.24 ppm und 1.47 ppm

Acetonid des Dodonaea-Esteraglykon 2

(CDCl₃, Standard: TMS, D₂O-Austausch)

H und Methyl:

ppm	Zuordnung	ppm	Zuordnung
0.92	23-Methyl	3.21 (m)	3β-H
0.79	24-Methyl	4.19 (d, J= 6.8 Hz)	15α-H
0.90	25-Methyl	3.89 (3, J= 6.8 Hz)	16α-H
0.89	26-Methyl	5.40 (d, J=10.1 Hz)	} 21β-H
1.61	27-Methyl	5.87 (d, J=10.1 Hz)	
0.98	29-Methyl	2.98 (d, J=11.8 Hz)	28-H
1.07	30-Methyl	3.30 (d, J=11.8 Hz)	28-H
		5.49 (m)	12-H

Angelicasäure: α-Methyl 1.85 ppm (s)
 β-Methyl 2.02 ppm (d, J= 7 Hz)
 β-H 6.24 ppm (q, J= 7 Hz)

"Säure 3": H 3.03 ppm (q, J=5.3 Hz)
 Methyl 1.31 ppm (d, J=5.3 Hz)
 Methyl~1.3 ppm (s)

Acetonid-Methyl: 1.25 ppm und 1.40 ppm

3. Massenspektren der partiell methylierten Alditolacetate

1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-hexitol

(m/z) (rel. Int. %):

C-1 D: 43(100), 44(13), 45(36), 71(11), 87(15), 88(8),
 89(15), 101(16), 102(44), 118(44), 129(35),
 145(42), 161(17), 162(16), 205(23)

1,4-Di-O-acetyl-2,3,5-tri-O-methyl-pentitol

(m/z) (rel. Int. %):

C-1 D: 43(100), 44(13), 45(39), 71(13), 87(21), 101(20),
102(28), 118(100), 129(54), 161(25), 162(5)

1,2,3,5,6-Penta-O-acetyl-4-O-methyl-hexitol

(m/z) (rel. Int. %):

C-1 D: 43(100), 44(24), 86(12), 89(17), 100(9), 127(22),
C-6 2D 131(66), 160(4), 191(34), 202(5), 262(15)

Weitere MS-Daten sind im Allgemeinen Teil enthalten:

Tabelle 1, Tabelle 4, Abb. 14, Abb. 23 sowie unter IV.3.4.
und V.3.

4. Optische Drehung, Schmelzpunkte und IR-Daten der
Aglykone

Aglykon	$(\alpha)_D^{20}$	Schmp.	IR-Daten (cm^{-1})
Dodonaea- Aglykon	+36 ° (MeOH, c=0.30)	300- 305 °C	3360, 2950, 1460, 1380, 1250, 1090, 1030
Schefflera Aglykon 1	+75 ° (MeOH, c=0.13)	296- 298 °C	3430, 2940, 1690, 1460, 1390
Schefflera Aglykon 2	+12 ° (MeOH, c=0.07)	285- 288 °C	3450, 2940, 1690, 1450, 1370

VI. Pharmakologische Untersuchungen

1. Viscarin-Carrageenin-Ödemtest (101)

Versuchsbedingungen

Tiermaterial:	weibliche und männliche Wistar-Ratten
Prüfsubstanz:	Dodonaea-Saponingemisch
Dosen:	0.5 mg/5ml/kg 0.7 mg/5ml/kg 1.0 mg/5ml/kg
Applikationsart:	i.v. (gelöst in Phosphatpuffer)
Referenzsubstanz:	Natriumaescinat
Dosis:	0.7 mg/5ml/kg
Applikationsart:	i.v. (gelöst in Phosphatpuffer)

Versuchsdurchführung

Vor der Provokation mit dem Irritans wird das Pfotenvolumen von narkotisierten Ratten der Versuchs- und Kontrollgruppe bestimmt. Die Messung erfolgt durch Eintauchen der Pfote in 0.2 %ige Prillösung und Bestimmung des verdrängten Volumens. Darauf wird das Irritans in die Pfoten injiziert und das Pfotenvolumen zu bestimmten Zeiten gemessen. Das Ödemvolumen wird aus der Differenz der zu den einzelnen Meßzeiten gemessenen Pfotenvolumina und dem Ausgangsvolumen ermittelt.

Auswertung

Der Anstieg der Ödemvolumina wird in Prozent ausgedrückt. Die Mittelwerte der Versuchsgruppe werden von denen der Kontrollgruppe abgezogen. Die Differenz, die der Ödemhemmung durch die geprüfte Substanz entspricht, wird in Prozent ausgedrückt.

2. Granulocyten-Test

(mod. nach BRANDT (122))

Granulocytensuspension

15 ml heparinisiertes Venenblut klinisch gesunder Erwachsener wurde mit 1.5 % Dextran T 500 (Pharmacia) 2:1 verdünnt. Nach 30 min wurde der Überstand 7 min bei 500 U/min zentrifugiert. Die Granulocyten im Bodensatz wurden zweimal mit je 5 ml RPM I-Puffer nachgewaschen. Darauf wurden die Granulocyten in ca. 5 ml Puffer suspendiert und auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Hefesuspension

Bäckerhefe wurde in isotonischer NaCl-Lösung suspendiert, auf 100 °C erhitzt, dreimal durch Gaze filtriert und auf $3-5 \times 10^7$ Partikel/ml eingestellt.

Poolserum

Eine Mischung des Serums 5 klinisch gesunder Erwachsener wurde in Portionen zu 5 ml eingefroren und zum Test mit isotonischer NaCl-Lösung 1:10 verdünnt.

Durchführung des Tests

Je 0.2 ml Poolserum, Granulocytensuspension und Hefesuspension wurden mit 0.2 ml Testlösung (bzw. 0.2 ml isotonischer NaCl-Lösung zur Kontrolle) versetzt und 10 min bei 37 °C inkubiert. 0.5 ml des Ansatzes wurden auf einen Objektträger gebracht und 35 min bei Raumtemperatur sedimentiert. Der Überstand wurde mit isotonischer NaCl-Lösung abgespült und die Objektträger mit einem Fön getrocknet.

Die Anfärbung des Präparates erfolgte nach der Pappenheim-Methode.

Berechnung des Phagocytose-Index

Der Phagocytose-Index errechnet sich aus der Summe der mikroskopisch gezählten, in einer bestimmten Anzahl von Granulocyten inkorporierten Hefezellen, dividiert durch die Anzahl der Granulocyten.

3. Chemoluminiszenz-Test (mod. nach ALLEN (123))

Herstellung der Lösungen

- a) PBS-Puffer ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , steril, Fa. Biochrom, Berlin
- b) Veronal-gepufferte Kochsalzlösung mit Ca^{2+} , Mg^{2+} , Glucose und Albumin
Stammlösung: 8.3 g NaCl, 1.02 g Veronal, 0.102 g MgCl_2 , und 0.022 g CaCl_2 wurden in 150 ml H_2O bidest. gelöst und nach Zugabe von 3.5 ml 1N HCl mit H_2O bidest. auf 200 ml aufgefüllt.
Testlösung: 40 ml der Stammlösung wurden mit 140 ml H_2O bidest. verdünnt, mit 1N HCl auf pH 7 gebracht und mit H_2O bidest. auf 200 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 200 mg reinem Rinder-Serumalbumin und 200 mg Glucose wurde sterilfiltriert.
- c) Lucigenin-Lösung:
Stammlösung: 25.5 mg/10 ml H_2O bidest.
Testlösung: Stammlösung mit H_2O bidest. 1:5 verdünnt
- d) Oponiertes Zymosan:
Vorratssuspension: 25 mg Zymosan wurden in 10 ml 0.9 % NaCl suspendiert und 30 min bei 90 °C im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Suspension in 2 ml Portionen eingefroren.
Testlösung: 2 ml Vorratssuspension wurden mit 2 ml Serum 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, zentrifugiert, mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und anschließend in 2 ml der NaCl-Lösung suspendiert.

Gewinnung der polymorphkernigen Leucocyten

20 ml Nativblut wurden zur Gerinnungshemmung mit 30 mg EDTA versetzt.

15 ml dieses Blutes wurden mit 7 ml Dextran in einer Spritze gemischt und 30 min bei Raumtemperatur belassen.

Der leucocytenhaltige Überstand wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Der aus Leucocyten und Restanteilen von Erythrocyten bestehende Niederschlag wurde durch hypotone Lyse von den restlichen Erythrocyten befreit. Hierzu wurde der Niederschlag in 0.2 % NaCl-Lösung suspendiert und 20 sec auf dem Whirlimix geschüttelt. Nach Zugabe von 20 ml 1.6 % NaCl-Lösung wurde nochmals geschüttelt. Darauf wurde 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und der gesamte Vorgang noch zweimal wiederholt.

Anschließend wurde der Niederschlag in 2 ml PBS-Puffer suspendiert und mit Türcks-Lösung 1:10 verdünnt. In der Neubauerkammer wurde die Suspension auf eine Zellzahl von 1000 Zellen/ μ l eingestellt.

Chemoluminiszenz-Messung

-630 μ l Veronal-gepufferte Kochsalzlösung

- 30 μ l PMNL-Suspension

-200 μ l PBS bzw. in PBS gelöste Substanz

-100 μ l Lucigenin-Lösung

Nach 1-2 min Temperieren im 6-Kanal-Biolumat (Fa. Beckman) wurden 40 μ l opsoniertes Zymosan zugegeben und die Messung gestartet. Meßende war nach 60 min.

4. Molluskizid-Test nach HOSTETTMANN (124)

Schnecken

Biomphalaria glabrata (Durchmesser des Schneckenhauses
ca. 9 mm)

Aquarium mit kontinuierlicher Zirkulation des deminerali-
sierten Wassers durch ein Eheim^R-Filtersystem.

Durchführung

Die Schnecken werden in die zu prüfende Lösung mit bekannter
Konzentration gebracht. Nach jeweils einer Stunde werden die
Schnecken auf einer Petrischale von unten beleuchtet und der
Herzschlag mit einem Mikroskop beobachtet.

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) ENGLER, A., Syllabus der Pflanzenfamilien, Bd. II, Gebrüder Bornträger Verlag, Berlin 1964
- 2) MEKKAWI, A.G., MOSSA, J.S., Pharmazie 36, 517 (1981)
- 3) CHOPRA, R.N., NAYAR, S.L., CHOPRA, I.C., Glossary of Indian Medicinal Plants, Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi 1956
- 4) HOPPE, H.A., Drogenkunde, Bd. I, Walter de Gruyter-Verlag, Berlin - New York 1975
- 5) LI, H.L., Woody Flora of Taiwan, Livingston Publishing Company, Narberth, Pennsylvania 1963
- 6) CHOPRA, R.N., BADHWAR, R.L., GOSH, S., Poisonous Plants of India, Vol. I, The Indian Council of Agricultural Research, New Delhi 1965
- 7) KOORDERS, S.H., VALETON, T., Atlas der Baumarten von Java, Bd. I, Verlag der Buch- und Steindruckerei Fa. Trap, Leiden 1913
- 8) BACKER, C.A., BAKHUIZEN VAN DEN BRINK, R.C., Flora of Java, Vol. II, N.V.P. Noordhoff, Groningen 1965
- 9) SUKKAWALA, V.M., DESAI, V.B., J. Sci. Ind. Res. (India) 21C, 349 (1962)
- 10) SACHDEV, K., KULSHRESHTHA, D.K., Indian J. Chem. 21B, 798 (1982)
- 11) KOTAKE, M., KUWATA, K., J. Chem. Soc. Japan, 57, 837 (1936)
- 12) HSÜ, H.-Y., CHEN, Y.P., KAKISAWA, H., Phytochemistry 10, 2813 (1971)
- 13) SACHDEV, K., KULSHRESHTHA, D.K., Planta med. 50, 448 (1984)
- 14) SACHDEV, K., KULSHRESHTHA, D.K., Phytochemistry 22, 1253 (1983)
- 15) NAIR, A.G.R., SUBRAMANIAN, S.S., Indian J. Chem. 13, 639 (1975)
- 16) DREYER, D.L., Rev. Latinoamer. Quim. 9, 97 (1978)
- 17) SASTRY, K.N.S., NAYUDAMMA, Y., Leather Sci. 13, 174 (1966)
- 18) SARIN, Y.K., KAPOOR, L.D., Bull. Reg. Res. Lab. Jammu, India, 1, 136 (1963)
- 19) VICKERY, J.R., J. Am. Oil Chem. Soc. 57, 87 (1980)
- 20) SHERWANI, M.R.K., HASAN, S.Q., AHMAD, I., AHMAD, F., OSMAN, S.M., Chem. Ind. London 523 (1979)
- 21) PARIHAR, D.B., DUTT, S., Proc. Indian Acad. Sci. 26A, 56 (1947)
- 22) GRESHOFF, M., Apoth. Ztg. 8, 589 (1893)
- 23) HEGNAUER, R., Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. VI, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart 1964
- 24) WAGNER, H., BLADT, S., Praktikumsvorschriften des Instituts für Pharmazeutische Biologie der Universität München 1983

- 25) TSCHESCHE, R., WULFF, G., Chemie und Biologie der Saponine, in Zechmeister, L., Fortschritte in der Chemie organischer Naturstoffe, Vol. 30, Springer Verlag, Wien - New York 1973
- 26) WINKLER, W., Kolloid-Z. 177, 63 (1961)
- 27) WAGNER, J., SCHLEMMER, W., HOFMANN, H., Arzneimittelforsch. 20, 205 (1970)
- 28) WULFF, G., TSCHESCHE, R., Tetrahedron 25, 415 (1969)
- 29) HILLER, K., ADLER, C., Pharmazie 37, 619 (1982)
- 30) TANIMURA, T., PISANO, J.J., ITO, Y., BOWMAN, R.L., Science 169, 54 (1970)
- 31) HOSTETTMANN, K., Planta med. 39, 1 (1980)
- 32) HOSTETTMANN, K., HOSTETTMANN-KALDAS, M., NAKANISHI, K., Helv. Chim. Acta 61, 1990 (1978)
- 33) HOSTETTMANN, K., Helv. Chim. Acta 63, 606 (1980)
- 34) ISHII, H., TORI, K., TOZYO, T., YOSHIMURA, Y., Chem. Pharm. Bull. 26, 674 (1978)
- 35) DOMON, B., HOSTETTMANN, K., Helv. Chim. Acta 66, 422 (1983)
- 36) OGIHARA, Y., INOUE, O., OTSUKA, H., KAWAI, K.-I., TANIMURA, T., SHIBATA, S., J. Chromatogr. 128, 218 (1976)
- 37) OTSUKA, H., MORITA, Y., OGIHARA, Y., SHIBATA, S., Planta med. 32, 9 (1977)
- 38) TANAKA, O., YAHARA, S., Phytochemistry 17, 1353 (1978)
- 39) YAHARA, S., TANAKA, O., NISHIOKA, I., Chem. Pharm. Bull. 26, 3010 (1978)
- 40) YAHARA, S., KAJI, K., TANAKA, O., Chem. Pharm. Bull. 27, 88 (1979)
- 41) OTSUKA, H., KOBAYASHI, S., SHIBATA, S., Planta med. 33, 152 (1978)
- 42) NICKL, H., Dissertation, Universität München 1982
- 43) OTT, S., Dissertation, Universität München 1980
- 44) HILLER, K., VOIGT, G., Pharmazie 32, 365 (1977)
- 45) HILLER, K., KEIPERT, M., LINZER, B., Pharmazie 21, 713 (1966)
- 46) HAYNES, L.J., PLIMMER, J.R., SUE-HO, W.M., J. Chem. Soc. London 744 (1963)
- 47) SAVOIR, R., TURSCH, B., KAISIN, M., Tetrahedron Lett. 2129 (1967)
- 48) HILLER, K., LINZER, B., PFEIFER, S., TÖKES, L., MURPHY, J., Pharmazie 23, 376 (1968)
- 49) FENGEL, D., PRZYKLENK, M., WEGENER, G., Das Papier 30, 240 (1976)
- 50) BLAKE, J.D., RICHARDS, G.N., Carbohydr. Res. 8, 275 (1968)
- 51) KARTNIG, T., WEGSCHAUER, O., J. Chromatogr. 61, 375 (1971)
- 52) RAPP, U., MEYERHOFF, G., DIELMANN, G., Finnigan MAT Firmenschrift Nr. 47
- 53) BRUINS, A.P., Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys. 48, 185 (1983)
- 54) BRUINS, A.P., Biomed. Mass Spectrom. 8, 31 (1981)

- 55) SCHULTEN, H.-R., KOMORI, T., KAWASAKI, T., *Tetrahedron* 33, 2595 (1977)
- 56) SCHULTEN, H.-R., GAMES, D.E., *Biomed. Mass Spectrom.* 1, 120 (1974)
- 57) BECKEY, H.D., SCHULTEN, H.-R., *Angew. Chem.* 87, 425 (1975)
- 58) KLÖPPEL, K.D., WEYER, K., VON BÜNAU, G., *GIT Fachz. Lab.* 28, 258 (1984)
- 59) BARBER, M., BORDOLI, R.S., SEDGWICK, R.D., TYLER, A.N., *Nature* 293, 270 (1981)
- 60) ABDEL-AKHER, M., HAMILTON, J.K., SMITH, F., *J. Am. Chem. Soc.* 73, 4691 (1951)
- 61) ALBERSHEIM, P., NEVINS, D.J., ENGLISH, P.D., KARR, A., *Carbohydr. Res.* 5, 340 (1967)
- 62) LEHRFELD, J., *Anal. Biochem.* 115, 410 (1981)
- 63) BJÖRNDAL, H., HELLERQVIST, C.G., LINDBERG, B., SVENSSON, S., *Angew. Chem.* 82, 643 (1970)
- 64) HAWORTH, W.N., *J. Chem. Soc. (London)* 107, 8 (1915)
- 65) PURDIE, T., IRVINE, J.C., *J. Chem. Soc. (London)* 83, 1021 (1903)
- 66) KUHN, R., TRISCHMANN, H., LÖW, I., *Angew. Chem.* 67, 32 (1955)
- 67) WALLENFELS, K., BECHTLER, G., KUHN, R., TRISCHMANN, H., EGGE, H., *Angew. Chem.* 75, 1014 (1963)
- 68) HAKOMORI, S.-I., *J. Biochem. (Tokyo)* 55, 205 (1964)
- 69) JANSSON, P.E., KENNE, L., LIEDGREN, H., LINDBERG, B., LÖNNGREN, J., *Chem. Comm. (Stockholm Univ.)* 8 (1976)
- 70) FORGACS, P., PROVOST, J., *Phytochemistry* 20, 1689 (1981)
- 71) NISHIMOTO, N., NAKAI, S., TAKAGI, N., HAYASHI, S., TAKEMOTO, T., ODASHIMA, S., KIZU, H., WADA, Y., *Phytochemistry* 23, 139 (1984)
- 72) SAKUMA, S., SHOJI, J., *Chem. Pharm. Bull.* 30, 810 (1981)
- 73) BESSO, H., KASAI, R., SARUWATARI, Y., FUWA, T., TANAKA, O., *Chem. Pharm. Bull.* 30, 2380 (1982)
- 74) KIMATA, H., NAKASHIMA, T., KOKUBUN, S., NAKAYAMA, K., MITOMA, Y., KITAHARA, T., YATA, N., TANAKA, O., *Chem. Pharm. Bull.* 31, 1998 (1983)
- 75) KASAI, R., BESSO, H., TANAKA, O., SARUWATARI, Y., FUWA, T., *Chem. Pharm. Bull.* 31, 2120 (1983)
- 76) HILLER, K., VOIGT, G., DÖHNERT, H., *Pharmazie* 36, 844 (1981)
- 77) HOLLSTEIN, E., KEIPERT, M., HILLER, K., *Pharmazie* 25, 366 (1970)
- 78) HILLER, K., PAULICK, A., DÖHNERT, H., FRANKE, P., *Pharmazie* 34, 565 (1979)
- 79) YOSIOKA, I., SAIJOH, S., KITAGAWA, I., *Chem. Pharm. Bull.* 20, 564 (1972)
- 80) KUPCHAN, S.M., TAKASUGI, M., SMITH, R.M., STEYN, P.S., *J. Org. Chem.* 36, 1972 (1971)
- 81) SHIMIZU, Y., PELLETIER, S.W., *J. Am. Chem. Soc.* 88, 1544 (1966)

- 82) SHOJI, J., KAWANISHI, S., TSUKITANI, Y., Chem. Pharm. Bull. 19, 1740 (1971)
- 83) TSCHESCHE, R., JHA, H.C., WULFF, G., Tetrahedron 29, 629 (1973)
- 84) KEIPERT, M., SCHNEIDER, G., HILLER, K., PFEIFER, S., TÖKES, L., NELSON, J., Pharmazie 30, 619 (1975)
- 85) KONOSHIMA, T., SAWADA, T., Chem. Pharm. Bull. 30, 2747 (1982)
- 86) WAGNER, J., SCHLEMMER, W., HOFFMANN, H., Arzneim. Forsch. 20, 205 (1970)
- 87) HENSENS, O.D., LEWIS, K.G., Tetrahedron Lett. 3213 (1968)
- 88) WAGNER, J., HOFFMANN, H., LÖW, I., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1133 (1970)
- 89) KLEIN, G., JURENITSCH, J., KUBELKA, W., Sci. Pharm. 50, 216 (1982)
- 90) KOIZUMI, H., SANADA, S., IDA, Y., SHOJI, J., Chem. Pharm. Bull. 30, 2393 (1982)
- 91) HUBER, H., BLINDENBACHER, F., MOHR, K., SPEISER, P., REICHSTEIN, T., Helv. Chim. Acta 34, 46 (1951)
- 92) YOSIOKA, J., NISHIMURA, T., MATSUDA, A., KITAGAWA, I., Chem. Pharm. Bull. 18, 1610 (1970)
- 93) ITO, S., OGINO, T., SUGIYAMA, H., KODAMA, M., Tetrahedron Lett. 2289 (1967)
- 94) HIGUCHI, R., KOMORI, T., KAWASAKI, T., v. LASSAK, E., Phytochemistry 22, 1235 (1983)
- 95) HEGNAUER, R., Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. III, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart 1964
- 96) OHWI, J., Flora of Japan, Eds.: MEYER, F.G., WALKER, E.H., Smithsonian Institution Washington D.C. 1965
- 97) JAIN, G.K., SARIN, J.P.S., KHANNA, N.M., Indian J. Chem. 15B, 1139 (1977)
- 98) TUNTIWACHWUTTIKUL, P., REUTRAKUL, V., THONGSRINUN, C., SRISUTHIPRUTH, A., CHANDRAPRASONG, C., J. Sci. Soc. Thailand, zit. nach C.A. 97, 159531y (1982)
- 99) WOITKE, H.-D., KAYSER, J.-P., HILLER, K., Pharmazie 25, 213 (1970)
- 100) LÖRENZ, D., MAREK, M.L., Arzneim. Forsch. 10, 263 (1960)
- 101) FA. MADAUS, Pers. Mitteilung 1983
- 102) TSCHESCHE, R., WEBER, A., WULFF, G., Liebigs Ann. Chem. 721, 209 (1969)
- 103) JACKER, H.-J., HILLER, K., Pharmazie 31, 747 (1976)
- 104) HILLER, K., KEIPERT, M., PFEIFER, S., KRAFT, R., Pharmazie 29, 54 (1974)
- 105) HILLER, K., KEIPERT, M., MISSBACH, U., LEHMANN, G., Pharmazie 30, 336 (1975)
- 106) JACKER, H.-J., VOIGT, G., HILLER, K., Pharmazie 37, 380 (1982)
- 107) HILLER, K., GENZEL, S., MURACH, M., FRANKE, P., Pharmazie 30, 188 (1975)
- 108) KAWASHIMA, K., LEE, E.B., HIRAI, T., TAKEUCHI, K., TAKAGI, K., Chem. Pharm. Bull. 20, 755 (1972)

- 109) TAKAGI, K., PARK, E.-H., KATO, H., Chem. Pharm. Bull. 28, 1183 (1980)
- 110) WULFF, G., Dtsch. Apoth. Ztg. 108, 797 (1968)
- 111) ELGAMAL, M.H.A., EL-TAWIL, B.A.H., Planta med. 27, 159 (1975)
- 112) BENN, W.R., COLTON, F., PAPPO, R., J. Am. Chem. Soc. 79, 3920 (1957)
- 113) HÄNSEL, R., Dtsch. Apoth. Ztg. 124, 54 (1984)
- 114) GESSNER, O., Die Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa, Winter-Verlag, Heidelberg 1953
- 115) BREKHMAN, I.I., DARDYMOV, I.V., Lloydia 32, 46 (1969)
- 116) CURTZE, A., Dtsch. Apoth. 29, 8 (1977)
- 117) TRIPATHI, R.M., SEN, P.C., DAS, P.K., J. Ethnopharm. 1, 397 (1979)
- 118) HOUDAYER, H., ROUZE, P., DALSGAARD, K., METZGER, J.J., Ann. Immunol. (Poznan) 129c, 107 (1978), zit. nach (113)
- 119) CZETSCH-LINDENWALD, H.v., Südd. Apoth. Ztg. Stuttgart 217 (1945), zit. nach (113)
- 120) ZENYAKU KOGYO Co., Ltd., Jpn. Kokai Tokkyo Koho 80, 167, 300, zit. nach C.A. 94, 2146049 (1981)
- 121) LUTOMSKI, J., Pharm. Unserer Zeit 12, 149 (1983)
- 122) BRANDT, L., Scand. Haematol. Suppl. 2 (1967)
- 123) ALLEN, R.C., in "Bioluminescence and Chemoluminescence: Basic Chemistry and Analytical Applications", Eds.: DE LUCA and McELROY, pp 63-73, Academic Press, New York 1981
- 124) HOSTETTMANN, K., KIZU, H., TOMIMORI, T., Planta med. 44, 34 (1982)
- 125) LUGT, C.B., Planta med. 38, 68 (1980)
- 126) LIU, H.-W., NAKANISHI, K., Tetrahedron 38, 513 (1982)
- 127) MATOS, M.E.O., TOMASSINI, T.C.B., J. Nat. Prod. 46, 836 (1983)
- 128) SATI, O.P., PANT, G., HOSTETTMANN, K., Pharmazie 39, 581 (1984)
- 129) ALZERRECA, A., HART, G., Toxicol. Lett. 12, 151 (1982)
- 130) ISOBE, T., FUKUSHIGE, T., NODA, Y., Chem. Lett. 27 (1979)
- 131) DOSSAJI, S., KUBO, I., Phytochemistry 19, 482 (1980)
- 132) DOS SANTOS FILHO, D., SARTI, S.J., VICHNEWSKI, W., BULHOES, M.S., De FREITAS LEITAO FILHO, H., Rev. Fac. Farm. Odontol. Ribeirao Preto (Univ. Sao Paulo) 17, 43 (1980), zit. nach (138)
- 133) MARADAFU, A., OUMA, J.H., Phytochemistry 17, 823 (1978)
- 134) KUBO, I., MATSUMOTO, A., J. Agric. Food Chem. 32, 687 (1984)
- 135) TOMASSINI, T.C.B., MATOS, M.E.O., Phytochemistry 18, 663 (1979)
- 136) NAKANISHI, K., KUBO, I., Israel J. Chem. 16, 28 (1977)
- 137) KUBO, I., MATSUMOTO, T., KAKOOKO, A.B., MUBIRU, N.K., Chem. Lett. 979 (1983)
- 138) MARSTON, A., HOSTETTMANN, K., Phytochemistry 24, 639 (1985)

- 139) SHOEB, H.A., El-EMAM, M.A., Proc. Int. Conf. Schistosomiasis 1, 487 (1975), zit. nach C.A. 89, 158704e (1978)
- 140) SULLIVAN, J.T., RICHARDS, C.S., LLOYD, H.A., KRISHNA, G., Planta med. 44, 175 (1982)
- 141) AYOUB, S.M.H., Planta med. 46, 181 (1982)
- 142) SCHAUFELBERGER, D., HOSTETTMANN, K., Planta med. 48, 105 (1983)
- 143) MARSTON, A., MSONTHI, J.D., HOSTETTMANN, K., Planta med. 50, 279 (1984)
- 144) BROOKER, R.M., EBLE, J.N., STARKOVSKY, N.A., Lloydia 30, 73 (1967)
- 145) JOHNS, T., GRAHAM, K., TOWERS, G.H.N., Phytochemistry 21, 2737 (1982)
- 146) KUBO, I., MATSUMOTO, T., KLOCKE, J.A., KAMIKAWA, T., Experientia 40, 340 (1984)

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München angefertigt.

Für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit möchte ich ganz besonders danken:

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. H. Wagner, für die Anregung zu dieser Arbeit, deren großzügige Förderung und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Den Hamdard Laboratories, New Delhi, für die Beschaffung des Drogenmaterials und Herrn Professor Dr. M.E. Hamdard, Dhahran, Saudi-Arabien, für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Dr. L. Grotjahn und Herrn Dr. V. Wray der Firma GBF in Braunschweig für die Aufnahme der FAB-MS und ^1H -NMR-Spektren sowie für die freundlichen und hilfreichen Diskussionen.

Herrn Privat-Dozent Dr. Wrackmeyer, Institut für Anorganische Chemie der Universität München, für die Aufnahme der ^{13}C -NMR-Spektren.

Herrn Professor Dr. W. Schäfer, MPI, Martinsried, für die rasche Durchführung der GC/MS-Analysen.

Herrn Dr. O. Seligmann für die Durchführung der chemisch-physikalischen Untersuchungen am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München.

Herrn Seidl, Institut für Organische Chemie der Universität München für die Aufnahme einiger Massenspektren.

Herrn Professor Dr. K. Hostettmann, „Ecole de Pharmacie Lausanne, der Fa. Madaus, Köln, Frau Dr. K. Jurcic und Herrn T. Bayer für die Durchführung von pharmakologischen Tests.

Schließlich möchte ich allen meinen Kollegen und Institutsangehörigen, die auf verschiedenste Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

L E B E N S L A U F

Christine L u d w i g

geboren am 24. 4. 1958 in München

Eltern: Anton Ludwig, Dipl.-Ing.

Hannelore Ludwig, geb. Greil

Schul Ausbildung: 1964 - 1968 Volksschule München

1968 - 1977 Louise-Schröder-Gymnasium
München

Juni 1977 Abitur

Studium der Pharmazie: WS 1977/78 bis WS 1980/81

2. Prüfungsabschnitt

der Pharm. Prüfung: Mai 1981

Pharmazie-Praktikum: Mai 1981 bis Mai 1982
Marien-Apotheke München

3. Prüfungsabschnitt

der Pharm. Prüfung: 1. Juli 1982

Approbation: Juli 1982

Wissenschaftliche

Tätigkeit: 1. August 1982 Beginn der vorliegenden Arbeit unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München mit gleichzeitiger Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft

